

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Fakulta tělesné výchovy a sportu

Oxid dusnatý a jeho neurofyzilogická role

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce:

Doc. MUDr. Jakub Otáhal, PhD

Spracoval:

Gabriela Dobrovodská

marec 2012

Prehlasujem, že som záverečnú diplomovú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť neboli predložené k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa

.....

podpis diplomanta

Evidenčný list

Súhlasím zo zapožičaním svojej diplomovej práce k študijným účelom. Užívateľ svojím podpisom potvrdzuje, že túto diplomovú prácu použil k štúdiu a prehlasuje, že ju uvedie medzi použitými prameňmi.

Meno a priezvisko:

Fakulta / katedra:

Dátum vypožičania:

Podpis:

Podakovanie

Touto cestou by som chcela podakovať doc. MUDr. Jakubovi Otáhalovi, Ph.D. za odborné vedenie práce, za praktické rady a za možnosť využiť jeho skúsenosti v tejto problematike. Bez spolupráce vyššie menovaného by táto práca nevznikla.

Súhrn

Názov práce: Oxid dusnatý a jeho neurofyziologická rola

Ciele práce: Hlavným cieľom diplomovej práce je zhodnotiť rolu oxidu dusnatého a jeho účinky v priebehu epileptického záchvatu u potkanov. V teoretickej časti tejto práce sumarizujem doterajšie poznatky ohľadom oxidu dusnatého a jeho vplyve na organizmus človeka a realizáciou môjho experimentu budem predpokladať pozitívny efekt inhibítora oxidu dusnatého pri epileptických záchvatoch u potkanoch.

Metóda: Experiment bude vykonaný v laboratóriu ústavov Akadémie vied Českej republiky. Realizácia prebehne skúmaním súboru desiatich potkanov, šiestim sa aplikuje N^{ω} -propyl-L-arginín (L-NPA) v množstve 0,5mg na jednu stranu, čo sa uskutoční bilaterálne do mozgovej komory. Následne po 10 minútach bude vykonaná aplikácia 4-aminopyridínu (4-AP) do mozgovej komory bilaterálne v množstve 0,5 μ l. Kontrolnej skupine pozostávajúcej zo štyroch potkanov bude zavedený namiesto L-NPA fyziologický roztok. Experiment bude prebiehať počas 2 dní.

Výsledky: Priebeh epileptického záchvatu s aplikáciou L-NPA skúmanej skupine bol porovnaný s kontrolnou skupinou. Experimentom sa potvrdil pozitívny efekt L-NPA v zmysle oddialenia a zmiernenia záchvatu.

Kľúčové slová: oxid dusnatý, N^{ω} -propyl-L-arginín, neurovaskulárny coupling, 4 – aminopyridín, epilepsia

Abstract

Title: Nitric oxide and its neurophysiologic role

Objectives: The main aim of my diploma work is to evaluate the role of nitric oxide and its effects during epileptic seizure in rats. I summarize the present knowledge about nitric oxide and its effects on human organism in the theoretical section of this paper and I will suppose the positive effect of nitric oxide inhibitor in epileptic seizures in rats by the realization of my experiment.

Methods: The experiment will be performed in the laboratory of Academy of Science of Czech Republic. Implementation will come through examining a set of ten rats. The first six will be given v (L-NPA) in an amount of 0,5mg to one side, which will take place by applying bilaterally to coele. Then after ten minutes 0,5µl of 4-aminopyridine (4-AP) will be applied bilaterally to coele. The control group, consisting of four rats will be given saline instead of L-NPA. The experiment will run for two days.

Results: The course of epileptic seizure with application of L-NPA to examined group was compared with the control group. The experiment confirmed the positive effect of L-NPA in terms of delay and reduction of seizure.

Keywords: nitric oxide, N^o-propyl-l-arginine, neurovascular coupling, 4-aminopyridine, epilepsy

Obsah

1	Úvod	14
2	Teoretická časť	16
2.1	Oxid dusnatý v organizmu človeka.....	16
2.2	Vznik a zdroje oxidu dusnatého	16
2.2.1	Syntáza oxidu dusnatého –rozdelenie	16
2.2.2	L-arginin	18
2.2.3	Mitochondrie ako zdroj NO	18
2.2.4	Potraviny podporujúce NO	19
2.3	Účinky oxidu dusnatého.....	20
2.3.1	Kardiovaskulárny systém.....	20
2.3.2	Dýchací systém	20
2.3.3	Gastrointestinálny systém	21
2.3.4	Uropoetický systém	21
2.3.5	Nervový systém	22
2.3.6	Imunitný systém.....	22
2.4	Transport oxidu dusnatého	22
2.5	Neurovaskulárny coupling	23
2.6	Peroxynitrit.....	24
2.6.1	Vznik peroxynitritu	24
2.6.2	Účinky peroxinitritu v organizme človeka	24
2.6.3	Apoptóza a peroxynitrit	25
2.6.4	Protektíva – peroxynitrit	25
2.7	Epilepsia.....	26
2.7.1	Epilepsia všeobecne	26
2.7.2	Epidemiológia	26

2.7.3	Etioopatogenéza.....	27
2.7.4	Epileptický záchvat.....	27
2.7.5	Status epilepticus	28
3	Ciele práce, výskumné otázky a hypotézy	29
3.1	Ciele práce.....	29
3.2	Výskumné otázky.....	29
3.3	Hypotézy	30
4	Metódy a postup riešení.....	31
4.1	Skúmaný súbor.....	31
4.2	Liečivá.....	31
4.3	Priebeh experimentu.....	31
4.3.1	Použité nástroje.....	31
4.3.2	Postup testovania	32
4.3.3	Analýza dat	33
5	Výsledky.....	34
5.1	Hodnotenie frekvencie a intenzity prejavov epileptického záchvatu v závislosti od času jednotlivých zvierat.....	34
5.1.1	Hodnotenie zvierat'a č. 1	34
5.1.2	Hodnotenie zvierat'a č. 2.....	35
5.1.3	Hodnotenie zvierat'a č. 3.....	36
5.1.4	Hodnotenie zvierat'a č. 4.....	36
5.1.5	Hodnotenie zvierat'a č. 5.....	37
5.1.6	Hodnotenie zvierat'a č. 6.....	38
5.1.7	Hodnotenie zvierat'a č. 7.....	39
5.1.8	Hodnotenie zvierat'a č. 8.....	40
5.1.9	Hodnotenie zvierat'a č. 9.....	41
5.1.10	Hodnotenie zvierat'a č. 10.....	42

5.2	Porovnanie a zhodnotenie priebehu epileptického záchvatu kompletnej skúmanej skupiny s kontrolným súborom zvierat.....	1
5.3	Hodnotenie doby nástupu prejavov epileptického záchvatu u oboch skupín ..	46
5.4	Hodnotenie celkového trvania záchvatu u oboch skupín.....	48
5.5	Štatistické porovnanie skúmanej a kontrolnej skupiny zvierat	50
6	Diskusia	54
7	Záver.....	58
	Použitá literatúra	59
	Prílohy.....	65

Zoznam tabuliek a grafov

Graf č. 1 – Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 1	1
Graf č. 2 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 2.....	1
Graf č. 3 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 4.....	1
Graf č. 4 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 5.....	1
Graf č. 5 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 6.....	1
Graf č. 6 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 7.....	1
Graf č. 7 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 8.....	1
Graf č. 8 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 9.....	1
Graf č. 9 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 10.....	42
Graf č. 10 – Porovnanie stupňa epileptického záchvatu podľa Racineho škály u všetkých zvierat zo skúmanej skupiny	1
Graf č. 11 - Porovnanie stupňa epileptického záchvatu podľa Racineho škály u všetkých zvierat z kontrolnej skupiny	1
Graf č. 12 – Porovnanie doby nástupu prvých záchvatov u zvierat zo skúmanej skupiny	1
Graf č. 13 - Porovnanie doby nástupu prvých záchvatov u zvierat z kontrolnej skupiny	1
Graf č. 14 – Porovnanie celkovej doby trvania epileptického záchvatu u jednotlivých zvierat zo skúmanej skupiny	1
Graf č. 15 - Porovnanie celkovej doby trvania epileptického záchvatu u jednotlivých zvierat z kontrolnej skupiny	1
graf č. 16 – Celkové porovnanie stupňa záchvatu skúmanej skupiny s kontrolnou	1
Graf č. 17 – Porovnanie dosiahnutého stupňa epileptického záchvatu u oboch skupín hodnotením Racineho škálou po dobu prvých 10 minút	1
Graf č. 18 - Porovnanie dosiahnutého stupňa epileptického záchvatu u oboch skupín hodnotením Racineho škálou po dobu 10 min – 60 min	1
Graf č. 19 - Porovnanie dosiahnutého stupňa epileptického záchvatu u oboch skupín hodnoteným Racineho škálou po dobu 1 hod – 5 hod	1
Tabuľka č. 1: Hodnotenie dosiahnutého stupňa počas prvých 30 minút priebehu epileptického záchvatu (Racineho škála) u skúmanej skupiny zvierat	70

Tabuľka č. 2: Hodnotenie dosiahnutého stupňa od prvých 30 min. – 300 minút priebehu epileptického záchvatu (Racineho škála) u skúmanej skupiny zvierat.....	71
Tabuľka č. 3: Hodnotenie dosiahnutého stupňa počas prvých 30 minút priebehu epileptického záchvatu (Racineho škála) u kontrolnej skupiny zvierat.....	72
Tabuľka č. 4: Hodnotenie dosiahnutého stupňa od prvých 30 min. – 300 minút priebehu epileptického záchvatu (Racineho škála) u kontrolnej skupiny zvierat.....	73
Tabuľka č. 5: Porovnanie priemerných hodnôt epileptického záchvatu (Racineho škála) a SEM medzi skúmanou skupinou a kontrolnou počas prvých 30 minút.....	74
Tabuľka č. 6: Porovnanie priemerných hodnôt epileptického záchvatu (Racineho škála) a SEM medzi skúmanou skupinou a kontrolnou počas doby od prvých 30 minút po 300 minút	75

Zoznam skratiek a ich definície

°C	- stupeň Celzia
20-HETE	- 20-hydroxyeicosatetraenoická kyselina
4-AP	- 4-aminopyridín
AA	- kyselina arachidonová
atm	- atmosféra (jednotka)
Ca ²⁺	- vápnik
CAT 1	- transportér kationovej aminokyseliny 1
CAT 2B	- transportér kationovej aminokyseliny 2B
CAT	- transportér kationovej aminokyseliny
cGMP	- cyklický guanozín monofosfát
CNS	- centrálny nervový systém
DAF	- senzitívny indikátor NO
EDRF	- endothelium-derived relaxing factor
EETs	- epoxyeicosatrienoický kyseliny
eNOS	- endoteliálna syntáza oxidu dusnatého
Fe ²⁺	- železo
GTP	- guanozín-trifosfát
iNOS	- indukibilná syntáza oxidu dusnatého
KVS	- kardiovaskulárny systém
LAT 1	- transportér l-aminokyseliny 1
LAT 2	- transportér l-aminokyseliny 2
L-NPA	- N ^ω -propyl-l-arginine
LPS	- lipolysacharid
m/s	- meter/sekunda
mGluR	- metabotropický glutamátový receptor
min	- minúta
ml	- mililiter
mm	- milimeter
mtNOS	- mitochondriálna syntáza oxidu dusnatého
N	- sodík
nm	- nanometer

NMDA	- N-metyl-d-asparát
NMDAR	- N-metyl-d-asparátový receptor
nNOS	- neuronálna syntáza oxidu dusnatého
NO	- oxid dusnatý
NOS	- syntáza oxidu dusnatého
O	- kyslík
O ₂	- dioxygén
PDZ	- PDZ doména
PG	- prostaglandín
PGC1 α	- prostaglandín C1 α
PLA ₂	- fosfolipáza A ₂
ppm	- parts per milion
PTP	- permeability transition pores
SEM	- smerodajná odchýlka
sGC	- rozpustná guanylát cykláza

1 Úvod

Donedávna bolo nemysliteľné považovať oxid dusnatý za signálnu molekulu v organizme človeka vzhľadom nato, že je to jeden z hlavných znečisťovateľov ovzdušia. Taktiež trvalo vedcom dlho, než začali prijímať názor, že práve NO by mohol zachraňovať životy (Ignarro, 2005). Avšak za pomoci Dr. Louisa J. Ignarra a jeho spolupracovníkov, ktorí vytrvalo pokračovali vo svojich výskumoch a objasňovaní otázok, ktoré vznikali, sa podarilo zistiť neodmysliteľnú rolu oxidu dusnatého v organizme človeka. Dokázali svojou precíznou prácou, že je pre náš organizmus zázračným prírodným liekom najmä na kardiovaskulárne ochorenia, ktorý si telo dokáže vytvoriť samo. I napriek jeho cennosti, je pre veľa ľudí neznámou látkou. Pod použitím termínu NO si väčšina predstaví kľúčovú zložku výbušnín, ako je napríklad dynamit, čím je v skutočnosti kyselina dusná alebo, že je to rajský plyn, s ktorým sa stretávame u dentistu, čo je oxid dusný. Niektorí si myslia, že ide o látku obsiahnutú v cigaretovom dyme tvoriacu škodlivú zložku výfukových plynov, ktoré sú príčinou smogu a kyslých dažďov, čo je i pravdou, avšak popisuje to, čo bolo považované za primárne účinky oxidu dusnatého predtým, než výsledky Dr. Louisa J. Ignarra a jeho spolupracovníkov dramaticky zmenili názor vedeckého sveta na NO (Ignarro, 2005).

Už cez 100 rokov sa používal nitroglycerín na liečbu angina pectoris bez toho, aby sa vedel mechanizmus jeho účinku. Až Dr. Ignarro sa začal zaujímať o túto pozoruhodnú molekulu a postupne prišiel aj na mechanizmus pôsobenia a jeho dôležitosť pre organizmus človeka. NO je jednou z najmenších a najjednoduchších aktívnych molekúl a má hlavnú úlohu v kontrole takmer každej jednej bunky a orgánových funkcií v ľudskom tele. Je zároveň jediná endogénna molekula, ktorá má funkciu v organizme ako neurotransmitter, konštitutívny mediátor, inducibilný mediátor, cytoprotektívna molekula a taktiež aj molekula cytotoxická. Hlavné fyziologické funkcie NO ako vazodilatácia a relaxácia hladkého svalstva, sú sprostredkované cez veľké množstvo mechanizmov uvoľňovania a aktivity NO. NO podporuje i biologické aktivity pomocou molekulárnych mechanizmov závislej i nezávislej cGMP.

Na druhej strane môže mať NO drvivý dopad na človeka a to pomocou naviazania sa so superoxidom, s ktorým dochádza k vytvoreniu omnoho silnejšieho oxidantu - peroxynitritu (Pacher, Beckman, Liaudet, 2007).

V teoretickej časti mojej diplomovej práci sa preto chcem zamerať hlavne na NO a jeho popis v ľudskom tele. Ako vzniká, jeho tvorbu i ako môžeme dosiahnuť jeho zvýšenú produkciu, v ktorých látkach a potravinách sa nachádzajú podporné zložky jeho produkcie, taktiež aj transport v organizme človeka i jeho dôležité, pre život neodmysliteľné účinky. V tejto časti by som chcela ďalej sumarizovať dostupné poznatky, informácie, štúdie a tak popísať predovšetkým úlohu NO v organizme človeka, v procese neurovaskulárneho „couplingu“ do istej miery stručne aj epileptické záchvaty, a tak poskytnúť teoretické základy, východiska a objasnenie pojmov použitých v nasledujúcej časti mojej diplomovej práce.

V praktickej časti sa zameriam na popis experimentu, kde budem zisťovať spojitosť medzi NO a epilepsiou, vzájomné ovplyvnenie a to predovšetkým, či by sa inhibíciou tejto spomínanej molekuly dali ovplyvniť a zmierniť epileptické záchvaty. To by malo nastať na základe stanovených hypotéz vychádzajúcich z teoretickej časti mojej diplomovej práce.

2 Teoretická časť

2.1 Oxid dusnatý v organizmu človeka

NO je v biológii jednou z najjednoduchších molekúl tvorenou len dvoma atómami – atómom dusíku (N) a atómom kyslíka (O). Je taktiež jednou z najmenších molekúl patriacich k aktívnym molekulám v prírode. Aj napriek tomu patrí medzi všadeprítomnú, čo sa týka organizmu cicavcov (Ignarro, 2000). I napriek jednoduchej štruktúry sa v súčasnej dobe považuje za najvýznamnejšiu molekulu v tele, ktorá je zásadná pre zdravie človeka. Svojím spôsobom dokáže ovplyvniť všetky systémy v organizme (Ignarro, 2005).

NO je bezfarebný plyn pri izbovej teplote a tlaku (bod varu – 151,7 °C). Jeho maximálna rozpustnosť (pri parciálnom tlaku 1 atm) vo vode pri izbovej teplote a tlaku je priemerne 2 mm, čo je mierne vyššie ako rozpustnosť dioxygénu (O₂) vo vode (Steinert, Chernova, Forsythe, 2010).

NO je signálna molekula obvyčajne identifikovaná ako EDRF (endothelium – derived relaxing factor), sprostredkovateľ relaxácie ciev krvi. Je to malá, vysoko rozpustná molekula s krátkym časom života generovaná pomocou NOS (syntázy oxidu dusnatého) (Steinert, Chernova, Forsythe, 2010).

2.2 Vznik a zdroje oxidu dusnatého

Optimálnym zdrojom NO je samotné telo. Produkcia prebieha predovšetkým v endoteli ciev (Ignarro, 2005). Je tvorený päťelektrónovou oxidáciou terminálneho guanidino dusíku L-arginínu molekulárnym kyslíkom. $L\text{-arg} + O_2 \rightarrow NO + L\text{-cit}$. Reakciu katalyzuje len jeden enzým – NO syntáza (Southan, 1996), ktorá má tri izoformy (Hampl, 2000).

2.2.1 Syntáza oxidu dusnatého –rozdelenie

NOS 1 – nNOS = neuronálny, produkovaný v mozgu. Mozog je bohatým zdrojom NO syntázy a sprístupňuje prvú NOS telu človeka (Pacher, Beckman, Liaudet, 2007). Nachádza sa v cytozole – v niektorých periferných i centrálnych neurónoch, v bunkách epitelu a cievneho hladkého svala, v kostrovom svalstve (Maruna, 2006).

Nenachádza sa v gliách. Tvorí sa konštitutívne. Jeho hlavný fyziologický význam je neurotransmisia (vyskytuje sa aj ako neurotransmitter), neuromodulácia. Regulovaná je NO (spätnoväzbová inhibícia), fosforyláciou, Ca^{2+} (Hampl, 2000). Takže malá koncentrácia NO býva neuroprotektívna a sprostredkováva fyziologickú signalizáciu (neurotransmisia, vazodilatácia), kým vysoká koncentrácia poukazuje na imunitné/zápalové procesy a je neurotoxická. Pre jeho mobilitu (nenútenú cez bunkovú membránu) môže prechádzať skrz široký objem NO a jeho procesy sú limitované inaktiváciou ako je vychytávanie alebo degradácia. Predpokladalo sa, že NO môže taktiež pôsobiť ako spätný vychytávač v synapse, sprostredkuje prenos z cieľového neurónu a späť na synapsu, tak reguluje synaptickú plasticitu. Tie isté vlastnosti tiež povolia NO nesprostredkovať signál ďalej do ostatných zložiek a tým spôsobuje, že v bunke je nedostatok synaptickej aktivity alebo vylučovania NOS (Maruna, 2006).

Hoci nNOS bola prvá identifikovaná v mozgu, nNOS je vylučovaná aj v periférnom nervovom systéme a kostrových svaloch. V mnohých štúdiách bola na mŕtvych myšiach dokázaná existencia troch nNOS génov a ich spojené kombinácie. Sú tu štyri možné kombinácie nNOS (α , β , γ a μ). Dominantnou je nNOS α , ktorá obsahuje amino terminálnu PDZ doménu spájajúcu sa s NMDA receptorom v postsynaptickej časti. Interakcie nNOS s PDZ doménou ponúkajú nový prístup k liečbe neurotoxicity a svalovej dystrofie. nNOS β chýba táto štruktúra a tak býva menej často spájaná s NMDAR – sprostredkujúcej synaptickú aktivitu. nNOS γ má malú alebo žiadnu enzymatickú aktivitu. nNOS μ je podobný nNOS α , dominantne vytváraný v kostrovom svalstve ale do úvahy celkový 10% z nNOS v mozgu (Ihara a ostatní, 2006).

NOS 2 – iNOS (inducibilný), jeho tvorba je stimulovaná preinflatórnymi cytokínmi (Alderton, 2001). Za normálnych okolností v neliečených bunkách chýba. Narozdiel od NOS1/NOS3 nie je regulovaný zmenou intracelulárneho Ca^{2+} (Griffith, Babu, 1999), ale môže byť indukovaný takmer v každej bunke bakteriálnym lipopolysacharidom (LPS), cytokínmi a inými molekulami. (Ignarro, 2000). Taktiež sa nachádza v bunke v cytozole, najmä v makrofágoch, endotelu, epiteli, gliách, myocytoch srdca, hladkom svalstve. Hlavným významom je boj s infekciou a tumormi (cytotoxicita), (Hampl, 2000).

NOS 3 – eNOS (endoteliálny) – Je prvým objaveným zdrojom NO. Je tvorená konštantne, spájaná s kalveolami, vyskytujúca sa hlavne v cievnom endoteli, trombocytoch, srdcových myocytoch, pľúcnom a renálnom epiteli i v hipokampuse.

Hlavnou úlohou NOS 3 je regulácia cievneho tonu, prietoku krvi tkanivami, a krvného tlaku. eNOS je regulovaná fosforyláciou, Ca^{2+} , a moduláciou expresie (Hampl, 2000).

2.2.2 L-arginin

L-arginin je aminokyselina, ktorá zabezpečuje zlepšenie krvného toku a činnosti endoteliálnych buniek, pretože sa v tele mení na NO. Druhá aminokyselina, L-citrulín, je úzko spätá s L-argininom. L-citrulín sa v organizme mení na L-arginin, ktorý má za úlohu zvyšovať produkciu NO. L-arginin vyskytujúci sa v potravinách a potravinových doplnkoch sa dostáva do krvného toku a cirkuluje v organizme človeka. Prienikom do endoteliálnych buniek, ktoré tvoria výstelku hladkých svalov cievnych stien, dochádza k enzymatickej reakcii. Počas nich sa L-arginin premieňa na NO. Zvyšovaním hladiny L-argininu sa zvyšuje taktiež aj produkcia NO, ktorý má pozoruhodný pozitívny účinok na funkciu kardiovaskulárneho systému (KVS). Ak dochádza k súčinnosti L-argininu a L-citrullinu, stúpa výkon oxidu dusnatého. Medzi oboma aminokyselinami panuje výnimočný vzťah. Dlhú dobu si vedci mysleli, že L-arginin nevzniká v organizme človeka, ale že ho telo získava z funkčných potravín a nutraceutik. Bolo však objavené, že organizmus v skutočnosti dokáže vyrobiť L-arginin prostredníctvom jeho synergetickej interakcie s L-citrulinom. Poznáme to ako recyklačný proces L-citrulin/L-arginin. L-arginin sa v bunkách zmení na NO. V priebehu tohto procesu vzniká ako vedľajší produkt L-citrullin. Tento vedľajší produkt sa spoločne s ďalším L-citrulinom, ktorý sa dostáva do organizmu stravou alebo potravinovými doplnkami, rozkladá späť na L-arginin a ten sa ďalej mení na NO. Tento „turbokompresorový“ efekt recyklačného procesu L-citrullin/L-arginin podstatne zvyšuje produkciu NO (Ignarro, 2005).

L-arginín je dodávaný do buniek nositeľmi sprostredkovaním umožnenia difúzie, čo je špecifické pre kationové aminokyseliny. Tento systém transportu, je známy ako systém y^+ , pozostávajúci z dvoch membránových proteínov, CAT – 1 a CAT 2B (transportér kationovej aminokyseliny – 1 a 2B), a y^+L , ktorý je výsledkom aktivity heteromerickej aminokyseliny transportérov 4F2/ y^+LAT1 a 4F2/ y^+LAT 2. (Steinert, Chernova, Fersythe, 2010).

2.2.3 Mitochondrie ako zdroj NO

Mitochondrie môžu taktiež produkovať NO. Niekoľko laboratórií nedávno navrhlo, že mitochondria vytvára špecifické NOS a tak reprezentuje pôvod NO. Toto

znamená, že respiračný reťazec môže byť vystavený vysokej lokálnej koncentrácii NO postačujúci na modulovanie dýchania. Jeden z názorov, ako je možné ovplyvnenie dýchania pomocou NO je, že regulovanie funkcie uskutočňuje faktor špecifický pre intramitochondriálne prostredie – kalcium, vzhľadom na jeho spätnoväzbové vychytávanie v mitochondriách. Ghafourifar a Richter (1997, in Duchen 2004) v jednom z prvých opisov mtNOS sa domnievali, že výroba NO z preparátu izolovanej mitochondrie bola stimulovaná pribúdaním kalcia a spôsobila určitý pokles mitochondriálneho potenciálu. Giulivi (2003, in Duchen, 2004) na druhej strane dokázal, že enzým má očividne vysokú Ca^{2+} afinitu, takže je pravdepodobné, že je regulovaný pokojovým stupňom intramitochondriálneho kalcia (Giulivi, 2003). V experimente používajúc izolovanú mitochondriu, je vždy otázka naznačujúca neporušenosť preparátu, možnosť kontaminácie inou membránou alebo rozpustnej frakcie. V štúdiu Dedkova a kol. (2004, in Duchen, 2004) senzitívny indikátor NO, DAF – 2, bol vložený do bunky a cytozólový signál premiestnený cez priepustnosť membrány, vypúšťajúc farbivo v mitochondriálnych častiach. Mierne pridávanie kalcia zvýšilo vytváranie NO a odpoveď bola jasná – závislosť NO na mitochondriálnom spätnom vychytávaní Ca^{2+} .

Ďalšia pozoruhodná rola NO a mitochondrie bola popísaná v štúdiu Nisoliho a kol. (2003, in Duchen, 2004), ktorá poukazovala, že tvorba NO môže stimulovať senzitivizáciu mitochondriálnej biogenézy. To umožňuje cez cGMP závislý vzrast citlivosti PGC1 α .

Avšak nadmerná produkcia NO, v prítomnosti patologických stimulov môže spôsobiť poškodenie tkaniva. Vysoká koncentrácia NO v prítomnosti relatívne nízkeho kyslíkového napätia v tkanive môže spôsobiť inhibíciu respirácie. Niektoré skupiny dokazujú, že respirácia inhibovaná prítomnosťou kyslíka spôsobuje vzostup miery tvorby superoxidu pomocou dychového reťazca. Superoxid následne reaguje s NO produkciou peroxynitritu ktorý je vysoko reaktívny radikálny druh (Duchen, 2004).

2.2.4 Potraviny podporujúce NO

Existuje široký výber potravín, ktoré zlepšujú produkciu NO i celkové zdravie. Patria sem potraviny bohaté na antioxidanty (ananásový melón, avokádo, čučoriedky, brusnice, cícer, čierna fazuľa, cesnak, grapefruity, horká čokoláda, jablko, jahody, krab, kuracie prsia, losos, malé červené fazule, artičoky, banány, brokolica, zeler, čaj - čierny

a zelený, čierne slivky, červené víno, hrozno, pečeň, kukurica, ľanové semeno, mango, maliny, mrkva, orechy, obilie, ostružiny, otruby, pomaranče, paradajky, rybí olej, sladké zemiaky, špenát, sušené slivky, tmavé mäso, ustrica, papája, nátierka z búrskeho orechov, pšeničné klíčky, ružičková kapusta, semená, sójové boby, šťava z granátových jabĺk, slivky, čerešne a i.), potraviny bohaté na L-arginín a L-citrulín (búrske orechy, cícer, červené mäso, horká čokoláda, mandle, melóny, losos, sója, vlašské orechy), Potraviny bohaté na proteíny (búrske orechy, garnát, homár, chňapák, lieskové orechy, losos, mandle, mečiar, sójové boby, treska, tuniak, vajíčko, vlašské orechy), potraviny bohaté na omega-3 mastnú kyselinu (ančovičky, dyňové semená, kanolový olej, ľanový olej, losos, olej z pečeni tresky, makrela, mečiar, sardinky, tuniak, vlašské orechy) a tuky prospešujúce srdcu (kanolový olej, kukuričný olej, olivový olej (čistý a panenský), rastlinný olej, bodliakový olej, sezamový olej – ľahký a tmavý).

2.3 Účinky oxidu dusnatého

2.3.1 Kardiovaskulárny systém

V kardiovaskulárnom systéme má NO vplyv predovšetkým na udržiavanie cievneho tonu a krvného tlaku. Znižuje produkciu superoxidového radikálu v cievach a inhibuje oxidáciu lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL). Bazálna tvorba NO závisí od arteriálneho prietoku. NO je teda regulátorom systémovej a pľúcnej rezistencie, distribúcie krvného výdaja, koronárnej a cerebrálnej cirkulácie (Široká et al. 2006). Prostredníctvom vazodilatácie spôsobuje erekciu penisu. Selektívnym inhibítorom enzýmu rozkladajúceho cGMP (fosfodiesterázu typu 5) v corpus cavernosum je sildenafilcitrát (Viagra®), liečivo používané k terapii erektilnej dysfunkcie (Kupková, Beneš, 2004). NO má antitrombotický efekt, podieľa sa na inhibícii adhézie a agregácie trombocytov. Ďalej má vplyv i na tlmenie aktivácie leukocytov a má antiproliferačný účinok. Jeho nedostatok môže podporovať vazospazmus, trombózu a zápaly ciev (Förstermann, 2010).

2.3.2 Dýchací systém

Priame meranie koncentrácie NO ukázalo, že jeho tvorba v zdravých pľúcnych cievach (na rozdiel od systémových ciev) je za normálnych okolností minimálna. Inhalácia NO sa používa pri terapii akútnych i subakútnych pľúcnych hypertenzných stavoch. Má totiž bronchodilatačné účinky a dochádza preukázateľne k zníženiu tlaku

v pľúcach. Táto metóda sa ale zatiaľ nepoužíva ako bežný terapeutický postup, pretože inhalácia je spojená s niekoľko rizikami, napr.:

- Toxicita NO – za bezpečnú dávku inhalovaného NO je považované množstvo do 4 ppm, a to i po niekoľkých hodinách až dňoch. NO sa pri styku s kyslíkom mení do toxickej NO₂ a dochádza k poruche buniek. Množstvo toxického NO₂ vo vdychovanej zmesi nesmie byť vyššie ako 1-2 ppm.
- Tvorba methemoglobínu – NO sa po inhalácií veľmi rýchlo viaže na hemoglobín a vzniká nitrosil-Fe (II) hemoglobín a následne methemoglobám. Pri vdýchnutí nízkych koncentrácií NO (do 10 ppm) je hladina methemoglobínu nízka, teda do 2 % a jeho monitorovanie stačí jedenkrát za deň.
- Predĺženie času krvácania – spôsobuje to inhibícia adhézie a agregácie trombocytov.
- Závislosť – dlhodobá inhalácia NO môže spôsobiť závislosť a pri náhlom prerušení môže vyvolať až ťažkú hypoxémiu a náhly vzostup tlaku v pľúcnej tepne. Znižovanie koncentrácie inhalovaného NO musí byť postupné. (Král, 1998)

2.3.3 Gastrointestinálny systém

V myenterickom plexu gastrointestinálneho traktu sa NO uplatňuje ako neurotransmitter tým, že ovplyvňuje jeho motilitu. Relaxuje hladké svalstvo. Taktiež má ochranný vplyv na mukózne vrstvy gastrointestinálneho traktu. Pri ochrane mukóznej vrstvy žalúdka napodobuje niektoré funkcie prostaglandínu. (Pařízkova, Černý, Dostál, 1998).

2.3.4 Uropoetický systém

Zlepšuje funkciu obličiek, vyvoláva erekciu, nárast libida, zamedzuje predčasnému pôrodu pomocou zabráneniu vzniku kŕča svalu maternice (Keefer, 1999) NO významne ovplyvňuje renálne funkcie a renálnu hemodynamiku. Pri zvýšenej syntéze NO v glomeruloch infiltrovaných leukocyty prispieva k udržaniu perfúzie glomerulov a inhibícií trombózy (Kupková, Beneš, 2004).

2.3.5 Nervový systém

NO je za normálnych okolností dôležitým neuromodulátorom, ktorý sa zúčastňuje vývoja CNS, percepcie bolesti, neuronálnej plasticity a mechanizmov pamäti (Adamčová et al., 2003). NO pôsobí ako neurotransmitter v mozgu, mieche a periférnom nervovom systéme. Podieľa sa na uvoľňovaní hormónov z hypotalamo-hypofyzárneho systému. NO je taktiež považovaný za jeden z mediátorov bolesti (Pařízkova, Černý, Dostál, 1998).

2.3.6 Imunitný systém

V imunitnom systéme sa NO zúčastňuje nešpecifickej (humorálnej) imunity. Jedná sa o obranu najmä proti niektorým baktériám, vírusom, nádorom, zasahuje i do procesu fagocytózy a zápalu. NO moduluje zápalovou odpoveďou organizmu znížením leukocytárnej adhézie a infiltrácie v mikrocirkulácii a alterácií uvoľnených cytokínov (Pařízkova, Černý, Dostál, 1998). V obrane proti vírusom sa vyznačuje aktivácia interferónu γ , ktorý má antivirotické účinky (Kupková, Beneš, 2004). NO tiež inhibuje programovú bunkovú smrť (apoptózu) tým, že inhibuje apoptické fosforylačné signály. Inhibícia je spôsobená cGMP a G kinázou (Kupková, Beneš, 2004). Nadprodukcia NO, spôsobená aktivácia iNOS histamínom a bradikininom, sa nachádza u anafylaktickej reakcie (Pařízkova, Černý, Dostál, 1998).

2.4 Transport oxidu dusnatého

Molekula NO je hydrofóbná a ľahko difunduje. Hydrofobicita zabezpečuje rýchlejšiu difúziu cez lipidové membrány. Priemerná rýchlosť molekuly v izbovej teplote je 400 m/s.

NO je prechodný medzi kyslíkom O_2 a dusíkom N_2 . Molekula kyslíka má tri nepárové elektróny na separovaných orbitáloch, čo umožňuje ľahké reagovanie s väčšinou molekúl v organizme. Avšak nespárované elektróny sú silno viazané predovšetkým s kovom, najmä so železom - Fe^{2+} v hemoglobíne, a železo v cytochróm-c-oxidáze. Avšak ľahko sa môže viazať aj na voľné radikály druhým nepárovým elektrónom a tak vytvárajú ďalšie reakcie. Preto môže spôsobovať poškodenie voľnými radikálmi a predstavovať tak centrálnu rolu v oxidatívnom strese. V porovnaní s tým, N_2 patrí medzi vzácne plyny. Preto je NO menej reaktívny než samostatná molekula O_2 , má len jeden nepárový elektrón, ktorý umožňuje vytvorenie

pevnej väzby na Fe^{2+} v hem skupine, čo je dôležité pre aktiváciu guanylcyklázy a pomalú mitochondriálnu respiráciu so spojením cytochróm-c-oxidázou. Tak ako molekula kyslíka, NO tiež reaguje s voľnými radikálmi rýchlo, ale NO je konečný reťazec. Pretrváva v organizme in vivo len niekoľko sekúnd.

Hlavným receptorom NO je sGC (rozpusťná guanylcykláza), ktorá sprostredkováva produkciu cGMP z GTP. Produkcia cGMP pomocou sGC je hlavný signálny transdukčný mechanizmus NO. sGC obsahuje totiž rovnaký hemeoproporphyrín IX ako hemoglobín so železom v železnej forme, na ktorú sa NO napája s vysokou afinitou. Deoxyhemoglobín sa spája s NO s 10 000 násobne väčšou afinitou ako molekula kyslíka. Iba 5-10 nm NO je nevyhnutných pre aktiváciu sGC. NO môže difundovať z miesta odkiaľ je syntetizované do okolitých buniek, kde aktivuje sGC v cieľovom tkanive, ktoré produkuje cGMP. Následne, cGMP aktivuje cGMP – závislú kinázu v cieľovom tkanive, ktorá moduluje úroveň intracelulárneho kalcia a to spôsobuje veľký počet rôznych aktivít v danom tkanive (Pacher, Beckamn, Liaudet, 2007).

2.5 Neurovaskulárny coupling

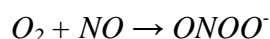
Je všeobecne akceptované, že v čase keď je aktivita mozgu v určitej časti (Mraovitch, 1996), v tejto lokalite sa automaticky zvýši aj tok krvi v mozgu (CBF), (Metea, 2006). Tento vzrast CBF je väčší než sprievodný vzrast kyslíkovej spotreby, výsledkom je teda zvýšenie miestneho okysličenia hemoglobínom (Mackert, B. M., 2004). Na procesy je nevyhnutné množstvo energie vo forme ATP, syntetizovanej oxidatívnym metabolizmom glukózy, ktorý vyžaduje kyslík. Metabolizmus mozgu tak závisí na stálom prísune glukózy a kyslíka, čo je udržiavané pomocou CBF (Pasley, Freeman, 2008). Vzostup CBF sa dosahuje dilatáciou arteriol, ktoré navodzujú vzrast prekrvenia v danej oblasti (Mackert, B. M., 2004). Popisuje teda vzťah a spojenie nervového systému s vaskulárnym systémom v mozgu (Pasley, Freeman, 2008). Znamená to, že ak je vyslaný aferentný podnet z periférie do mozgu, daná lokalita sa zaktivuje na neurologickej úrovni kde následne vzniká vazodilatácia odpovedajúcej časti (Weber, 2011). Táto vazodilatácia môže byť spôsobená viacerými mechanizmami (Mungrue, 2004). Jedným z nich je aktivácia N-metyl-d-asparátového receptoru (NMDAR), ktorý vedie k vzrastu intracelulárneho Ca^{2+} , aktivácií neuronálnej syntázy oxidu dusnatého (nNOS) a uvoľneniu NO. Ten následne dilatuje okolité cievy pomocou

cyklického guanosínmonofosfátu (cGMP). Ďalšia cesta zahŕňa vzrast intracelulárneho Ca^{2+} , od ktorého je závislá produkcia arachidonovej kyseliny (AA) cez fosfolipázu A_2 (PLA_2) a jej aktiváciu. To následne vedie k uvoľneniu prostaglandínu (PG) spôsobujúc vazodilatáciu. Dochádza ku glutamátovému nárastu Ca^{2+} v astrocytoch aktiváciou metabotropického glutamátového receptora (mGluR). To má 2 efekty:

- PLA_2 aktivácia vytvára AA a jej metabolity prostaglandíny a EETs, pričom obe pôsobia vazodilatáciu. Uvoľnenie AA môže vytvoriť 20-HETE v bunkách hladkého svalstva, čo spôsobuje konstrikcii ciev.
- Aktivácia kalcio-závislých K^+ kanálov spôsobí uvoľnenie K^+ , ktoré dilatuje cievy (Attwel et al., 2010).

2.6 Peroxynitrit

2.6.1 Vznik peroxynitritu



Vzniká zlúčením voľných kyslíkových radikálov s oxidom dusnatým (Gow et al., 2000). Má pomerne krátky život, ale postačujúci na prenikanie cez membrány a spôsobenie interakcie s mnohými biomolekulami. Bolo preukázané štúdiami, že peroxynitrit oxiduje cieľovú molekulu 2 spôsobmi.

1. Peroxynitrit a jeho protónová forma – peroxynitritová kyselina (ONOOH) môže priamo vykonávať modifikáciu. Len niektoré chemické skupiny reagujú priamo s peroxynitritom (napr. thioly, železo, siera, zinok)
2. Zahŕňa nepriamo sprostredkovanú oxidáciu peroxynitritu pomocou rozkladu na vysoko reaktívne radikály. Peroxynitrit môže poskytnúť hydroxylový radikál a oxid dusičitý (NO_2) (Pacher, Beckman, Liaudet, 2007).

2.6.2 Účinky peroxynitritu v organizme človeka

Pre organizmus je veľmi reaktívny a cytotoxický. Účinkuje:

1. Na proteíny
 - Reakcia peroxynitritu s prechodnými kovmi. Modifikuje proteíny obsahujúce hem skupinu ako hemoglobín, myoglobín, alebo cytochrom c.

- Reakcia peroxynitritu s aminokyselinami.
 - cystická oxidácia – peroxynitrit môže reagovať s aminokyselinami v peptidovom reťazci. Najčastejšie reaguje s cysteínom. Môže tak inaktivovať niektoré enzýmy zahrnuté v bunkovom energetickom procese.
 - Nitrácia tyrozínu – proteín tyrozín nitrácia je kovalentná s proteínovou modifikáciou s pridaním nitro (NO_2)
- Oxidácia tryptofanu, methioninu a histadínu

2. Na lipidy

Peroxynitrit môže hrať vážnu úlohu v zápalových ochoreniach nervového systému peroxidáciou myelínových lipidov vedúci k demyelinizácií. Taktiež modifikuje LDL, čím spôsobí častú aterosklerózu.

3. Na nukleové kyseliny

Peroxynitrit môže poškodiť DNA pomocou oxidatívnych modifikácií. Zo štyroch nukleobází guanín je najčastejšie reagujúci s peroxynitritom. Vedie k jeho roztriešteniu čo je krokom vedúcim k mutáciám a karcinogéze (Pacher, Beckman, Liaudet, 2007).

2.6.3 Apoptóza a peroxynitrit

Cytotoxické účinky peroxynitritu vedú až k bunkovej smrti. Spúšťa ju celý rad signalizačných kaskád. Jednou z nich je aj cytochrom c, ktorý je uvoľnený z mitochondrií otvorením kanálov PTP (permeability transition pores). Vplyv na tieto kanály má aj peroxynitrit. Apoptóza je charakteristický dôsledok vystaveniu sa peroxynitritu (Brown et al., 1999).

2.6.4 Protektíva – peroxynitrit

Štúdie z roku 1997 dokázali, že pokiaľ použijeme len nanomolekulárnu koncentráciu peroxynitritu môže mať na organizmus protektívne účinky v zmysle – schopnosť inhibovať adhéziu leukocytov na vaskulárny endotel, redukuje i srdečnú dysfunkciu spôsobenú neutrofilmi pri hypoxických stavoch (pri štúdiách na potkanoch),

chrániť koronárny endotel a redukovať veľkosť infarktu (u mačiek), (Brown et al., 1999).

2.7 Epilepsia

2.7.1 Epilepsia všeobecne

Epilepsia patrí medzi najčastejšie ochorenia centrálného nervového systému (Pfeiffer, 2007). Prejavom je opakovaný výskyt epileptických záchvatov (Nevšímalová et al., 2002) Nejde o jedno ochorenie, ale o súhrnné pomenovanie množstva chorôb s daným prejavom. Ak je prekonaný len jeden epileptický záchvat, nemôžeme ešte hovoriť o epilepsii. Až po niekoľkých opakovaných záchvatoch môžeme diagnostikovať ochorenie týmto termínom (Vojtěch, 2000). Epileptický záchvat je vyvolaný náhlou dysbalanciou excitačne – inhibičnej rovnováhy určitej neuronálnej populácie v mozgu, ktorá vedie prevahou excitačných mechanizmov k prejavu klinického alebo subklinického záchvatu (Nevšímalová, et al. 2002).

Klinické príznaky sú rôznorodé a početné:

- poruchy vedomia až úplná strata vedomia,
- motorické príznaky,
- vegetatívne príznaky,
- psychické príznaky (Pfeiffer, 2007).

Subklinický záchvat vyvoláva len paroxyzmálne epileptoformnú aktivitu EEG, ktorá nie je doprevádzaná klinickou symptomatológiou (Nevšímalová et al., 2002).

Príznaky sa môžu prejavovať izolovane, alebo rôzne asociovane. Môžu prebiehať generalizovane, alebo ložiskovo (fokálne/parciálne/čiasťočne), ktoré sa môžu druhotne rôzne rozširovať do ďalších oblastí mozgu, potom sú komplexné (Pfeiffer, 2007).

2.7.2 Epidemiológia

Štúdie ukazujú, že epilepsia postihuje všetky etnické rasy. Prevalencia je odhadovaná na 1,3–3,1 %. Muži sú postihnutí epilepsiou v priemere 1 až 2,5 krát častejšie oproti ženám. Výskyt v dospelosti sa zvyšuje po 60. roku veku (Nevšímalová et al., 2002). Incidencia sa líši najmä vekom. Vysoký počet prvých epilepsií sa vyskytuje v detskom veku, menej v skorom dospelom veku a druhý vrchol je u ľudí po 65 roku života (Brodie, Schachter, Kwan, 2005).

2.7.3 Etiopatogenéza

Príčinou epileptického záchvatu je dysbalancia medzi excitačnými a inhibičnými procesmi CNS vedúcimi k prevahe excitačnej zložky. Kľúčovú úlohu majú excitačné aminokyseliny (kyselina glutamová – glutamát a kyselina aspartová – asparát), zatiaľ čo inhibičným neurotransmitterom je kyselina γ -aminomaslová (GABA). Pri vzniku epileptických záchvatov sa uplatňujú tri faktory: 1. pohotovosť k záchvatu, 2. vznik ohniska, ktoré záchvaty vyvolá, a často aj 3. podnet ako spúšťač mechanizmus záchvatu (Nevšímalová et al., 2002).

2.7.4 Epileptický záchvat

Je to náhle vznikajúca a náhle končiaca porucha vedomia, ktorá je podmienená epileptickým výbojom v mozgu (Vojtěch, 2000). Na vznik epileptického záchvatu je potrebné určité množstvo epileptických neurónov, ktoré funkčne utvárajú komunitu abnormálne pracujúcich neurónov (tzv. epileptický agregát). Epileptický neurón je nervová bunka, ktorá na prívod vzruchov reaguje tvorbou paroxyzmálneho depolarizačného posunu. Príčinou je zmena vlastností bunkovej membrány na chemické, mechanické či elektrické podnety. Dôsledkom je séria rýchlo po sebe nasledujúcich akčných potenciálov. Aktivita jedného epileptického neurónu je ľahko zvládnuteľná inhibičnými mechanizmami mozgu. K vzniku epileptického ohniska je potrebné, aby počet epileptických neurónov prekročil kritické množstvo a synchronnou aktivitou vytváral ohniskové interiktálne výboje. Tým je podmienený vznik epileptického agregátu (Dolanský, 2000).

Základná medzinárodná klasifikácia delí epileptické záchvaty na: 1. parciálne, 2. generalizované, 3. skupinu neklasifikovaných epilepsií. Ďalšia subklasifikácia delí vyššie uvedené typy záchvatov podľa etiológie na idiopatické (kryptogénne) a symptomatické (Nevšímalová et al., 2002).

Parciálne (ložiskové, fokálne) záchvaty sú delené podľa prípadnej alternácie vedomia na jednoduché a komplexné (Nevšímalová et al., 2002). Ložisko alebo ohnisko epilepsie sa nachádza v niektorom z mozgových lalokov a záchvat sprevádzajú príznaky príznačné pre danú oblasť. Môžu sa prejavovať ako izolované príznaky ale často prechádzajú v sekundárnu generalizáciu veľkého kľúčového záchvatu. Pre sekundárny generalizovaný záchvat je charakteristický prodromálny príznak nazývaný aura (Pfeiffer, 2007).

Generalizované záchvaty sú sprevádzané od počiatku poruchou vedomia a bilaterálne motorickou manifestáciou. Podľa motorických prejavov sú delené na: 1. tonicko-klonické, 2. tonické, 3. myoklonické, 4. atonické záchvaty, 5. absencia, 6. generalizované epileptické syndrómy (Nevšímalová et al. 2002).

2.7.5 Status epilepticus

Pojmom status epilepticus sa označuje závažný, život ohrozujúci stav, pri ktorom epileptický záchvat neustáva, ale prechádza plynu v ďalší (Pfeiffer, 2007). Najčastejšie ide o kumuláciu generalizovaných tonicko-klonických záchvatov s trvaním jednotlivých záchvatov 2-3 minúty, ktoré sa opakujú v rýchlom časovom slede po dobu dlhšiu ako 30 minút a medzi ktorými spravidla nedochádza k návratu vedomia (Nevšímalová et al. 2002).

3 Ciele práce, výskumné otázky a hypotézy

3.1 Ciele práce

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce je vyskúmať vzťah inhibície nNOS k epileptickému záchvatu. Konkrétne, či nastávajú po aplikovaní inhibítora danej molekuly určité zmeny v organizme. Na základe plnenia tohto cieľu bola práca vykonaná a rozdelená na dve hlavné časti, ktoré majú rozdielne úlohy:

1. Teoretická časť:

Teoretická časť ma za úlohu sumarizovať, vytvoriť prehľad i zozbierať všetky možné a dostupné informácie, ktoré by mali oboznámiť o základných pojmoch použitých v praktickej časti diplomovej práce. Teda ich cieľom je vytvoriť vhodný základ na pochopenie jednotlivých vzťahov nachádzajúcich sa v experimente.

2. Praktická časť:

Hlavná úloha praktickej časti je predovšetkým podrobne popísať vykonaný experiment, ktorý ma za cieľ zistiť vzťah a účinok inhibítora NO na epileptické záchvaty u potkanov. To znamená, že sa zameriava na potvrdenie alebo vyvrátenie hypotéz vychádzajúcich z teoretického základu. Má informovať o skúmanom súbore, detailnom prevedení experimentu, kde sú na konci zaznamenané výsledky formou analýzy získaných a spracovaných dát do tabuliek a grafov.

3.2 Výskumné otázky

1. Zistiť, či vznikne rozdiel medzi skupinou šiestich potkanov, ktorým bol aplikovaný L-NPA a skupinou štyroch potkanov s použitím (namiesto spomínanej látky) fyziologického roztoku bilaterálne do mozgovej komory.

Nadväznosťou na predchádzajúcu výskumnú otázku, pri pozitívite rozdielov medzi dvoma skúmanými súbormi potkanov, je potrebné:

2. Zistiť a zhodnotiť či je možné záchvaty ovplyvniť a zmierniť inhibíciou nNOS.

3. Zaznamení doby nástupu spazmov u jednotlivých zvierat zistiť rozdiely v začatí prejavov epileptického záchvatu, či L-NPA dokáže oddialiť jeho vznik.
4. Zistiť celkovú dĺžku epileptického záchvatu teda, či je možné pomocou aplikovanej látky ovplyvniť dobu jeho trvania.
5. Zhodnotiť frekvenciu záchvatov, a tak overiť možnosť jej zníženia inhibíciu nNOS.

3.3 Hypotézy

Hypotéza 1: Ak aplikujeme L-NPA skupine šiestich potkanov, a ďalším štyrom namiesto tohto inhibítora NO zavedieme fyziologický roztok, uvidíme rozdiely v epileptických záchvatoch jednotlivých skupín.

Hypotéza 2: Pri prítomnosti rozdielov medzi skúmanou a kontrolnou skupinou potkanov, bude pozitivita v prospech L-NPA. Prejaví sa to celkovým zmiernením záchvatu, dlhším intervalom medzi aplikáciou danej látky a nástupom spazmov, zníži sa aj stupeň priebehu epileptického záchvatu.

4 Metódy a postup riešení

4.1 Skúmaný súbor

Skúmaný súbor pozostáva z desiatich potkanov mužského pohlavia s váhou od 410g do 460g. Poskytla ich Akadémie vied Českej republiky. Umiestnené boli pred a po experimente v štyroch klietkach pri izbovej teplote. Experiment prebiehal počas dňa, kedy po operačnom zákroku boli zvieratá po dobu monitorovania premiestnené každý do samostatnej klietky. Kontrolná skupina bola použitá len na jeden experiment, avšak skúmaná skupina mala byť použitá nasledovne po niekoľkých dňoch na ďalší výskum. Etická komisia, Praha, povolila použiť v danom experimente uvedené zvieratá.

4.2 Liečivá

V tomto experimente bol použitý 4-aminopyridín (4-AP) a N^ω-propyl-L-arginin (L-NPA). Tieto použité liečivá boli pod odborným dohľadom zarobené v laboratóriách Akadémie vied Českej republiky. Zriedili sa vo fyziologickom roztoku. 4-AP bol použitý v koncentrácií 10mmol a o množstve 0,5 μl. L-NPA sa aplikovalo v koncentrácií 50mg/400μl a o množstve 0,2 μl. Obe látky boli podané bilaterálne do mozgovej komory zvierat rýchlosťou 0,25 ml/s. L-NPA pôsobil ako inhibítor nNOS. 10 minút po aplikácii L-NPA došlo k podaniu 4-AP, ktorý mal za následok spustenie epileptických záchvatov u potkanov.

4.3 Priebeh experimentu

4.3.1 Použité nástroje

Počiatok epileptických záchvatov aj celý priebeh bol monitorovaný videokamerou. Každý potkan bol po operačnom zákroku zvážený a umiestnený do malého plastového akvária bez pokrývky. Po jednom bol postupne spustený čas od doby tesne po operácii až po dobu konca epileptického záchvatu. Monitorovaný a popisovaný bolo každé zviera zvlášť okrem videokamery aj písomným zaznamenaním.

4.3.2 Postup testovania

Testovanie prebiehalo počas dvoch dní. Každý deň bolo testovaných päť potkanov. V prvý deň, každé zviera bolo postupne po jednom najprv umiestnené do uzavretého plastového akvária, kde inhaláciou anestetika sa dostalo do stavu bezvedomia. Potom boli premiestňované na operačný stôl, kde im bola otvorená lebka odborným pracovníkom Akadémie vied Českej republiky. Prvému zo zvierat bol aplikovaný L-NPA bilaterálne v množstve 0,2 μ l, následne po 10 minútach prebehlo podanie unilaterálne 4-AP v množstve 0,5 μ l. Následne prebehla postupne aplikácia v nasledujúcich troch prípadoch prvého dňa, tvoriacich jednu skupinu, L-NPA bilaterálne do mozgovej komory o rýchlosti 0,25 ml/s v množstve 0,2 μ l pre jednu stranu. Následne po 10 minútach bol zavedený 4-AP rovnakou rýchlosťou bilaterálne v množstve 0,5 μ l pre jednu stranu.

Kontrolnej skupine pozostávajúcej z jedného zvieraťa použitého v prvý deň merania bol aplikovaný fyziologický roztok ako náhrada L-NPA 10 minút predtým ako mu bol podaný 4-AP. Kontrolnú skupinu prvý deň tvorilo len jedno zviera z dôvodu predčasného úmrtia jedného z piatich zvierat. Zvyšné štyri boli po operačnom zákroku zväžené a uložené do malých, vysokých plastových akvárií, v ktorých boli monitorované od začiatku status epilepticus až zastavenie spazmov (pre všetky celkovo cca 5 hodín). Následne boli všetky znovu zväžené a prebehla subkutánna aplikácia fyziologického roztoku (4 ml). Potom boli umiestnené do dvoch veľkých klietok.

Druhý deň experimentu prebehol o sedem dní. Kontrolnú skupinu tvorili dve zvieratá, základný skúmaný súbor tri zvieratá. Postupne po jednom zvierati skúmanej skupiny boli umiestňované všetky do uzavretého plastového akvária, kde inhalovali anestetikum. Následne boli presúvané na operačný stôl kde všetkým prvým trom bol podaný bilaterálne L-NPA v množstve 0,2 μ l do mozgovej komory. Po uplynutí doby 10 minút bolo aplikované všetkým zo skúmanej skupiny 4-AP bilaterálne v množstve 0,5 μ l. Priebeh aplikácie látok kontrolnej skupiny nasledujúcich dvoch zvierat mal rovnaký priebeh ako pri kontrolnej skupine prvého dňa. Všetky zvieratá boli po operačnom výkone zväžené a umiestnené do zhora neuzavretých plastových akvárií. Monitorovanie a pozorovanie sa uskutočnilo po dobu cca 5 hodín. Po zmiernení príp. skončení status epilepticus boli zvieratá znovu zväžené a bol im podaný subkutánne fyziologický roztok v množstve 4 ml.

4.3.3 Analýza dat

Výsledky experimentu sú prezentované v grafoch. Hodnotené sú u každého zvieraťa jednotlivo podľa reakcií a na záver sú porovnané navzájom v dvoch skupinách – skúmaný súbor s kontrolným. Zhodnotená je celková dĺžka trvania, frekvencia a intenzita záchvatov taktiež aj doba nástupu prvého spazmu od času ukončenia operatívneho zákroku.

Epileptické záchvaty sú hodnotené podľa Racineho stupnice (1972 in Pitkänen, Schwartzkroin, Moshé, 2006):

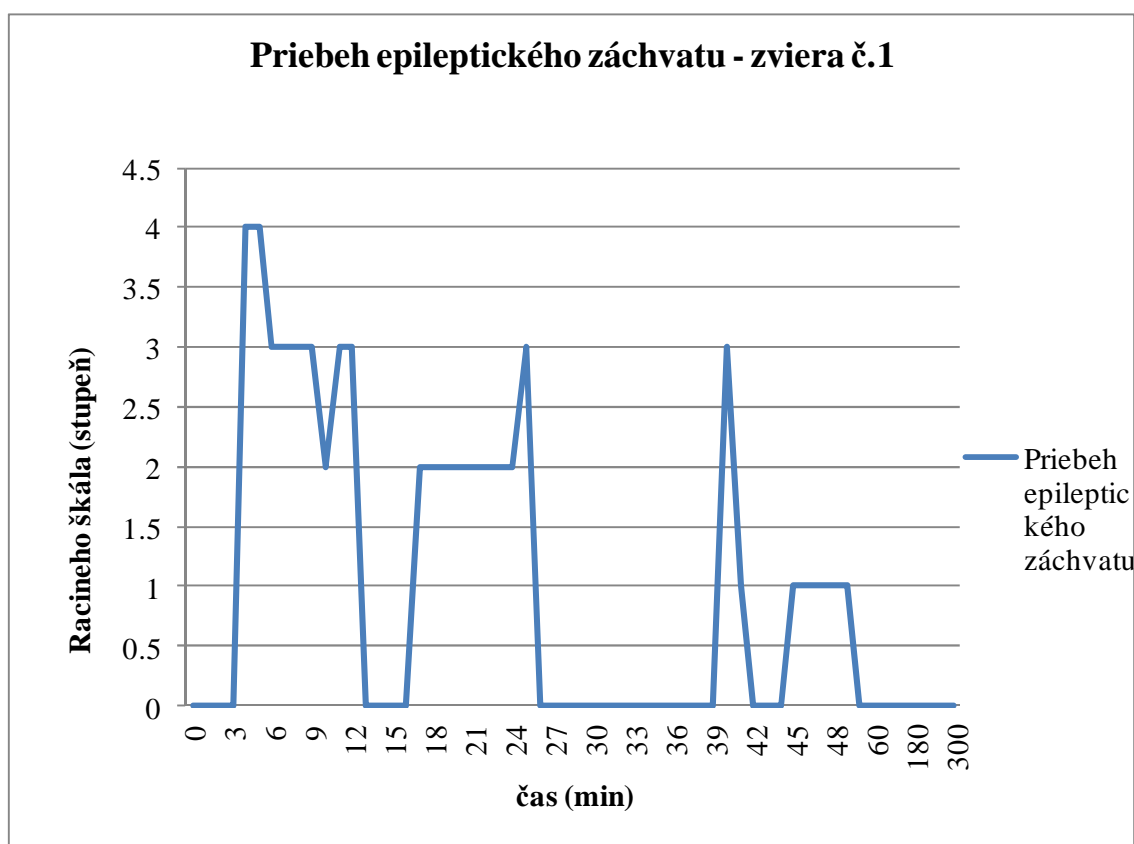
- 1.stupeň – Pohyby ústami a tváre
- 2.stupeň – Prikyvovanie hlavou
- 3.stupeň – Klonus končatín
- 4.stupeň – Šplhanie/ lezenie
- 5.stupeň – Šplhanie/ lezenie a pád

5 Výsledky

5.1 Hodnotenie frekvencie a intenzity prejavov epileptického záchvatu v závislosti od času jednotlivých zvierat

5.1.1 Hodnotenie zvierat'a č. 1

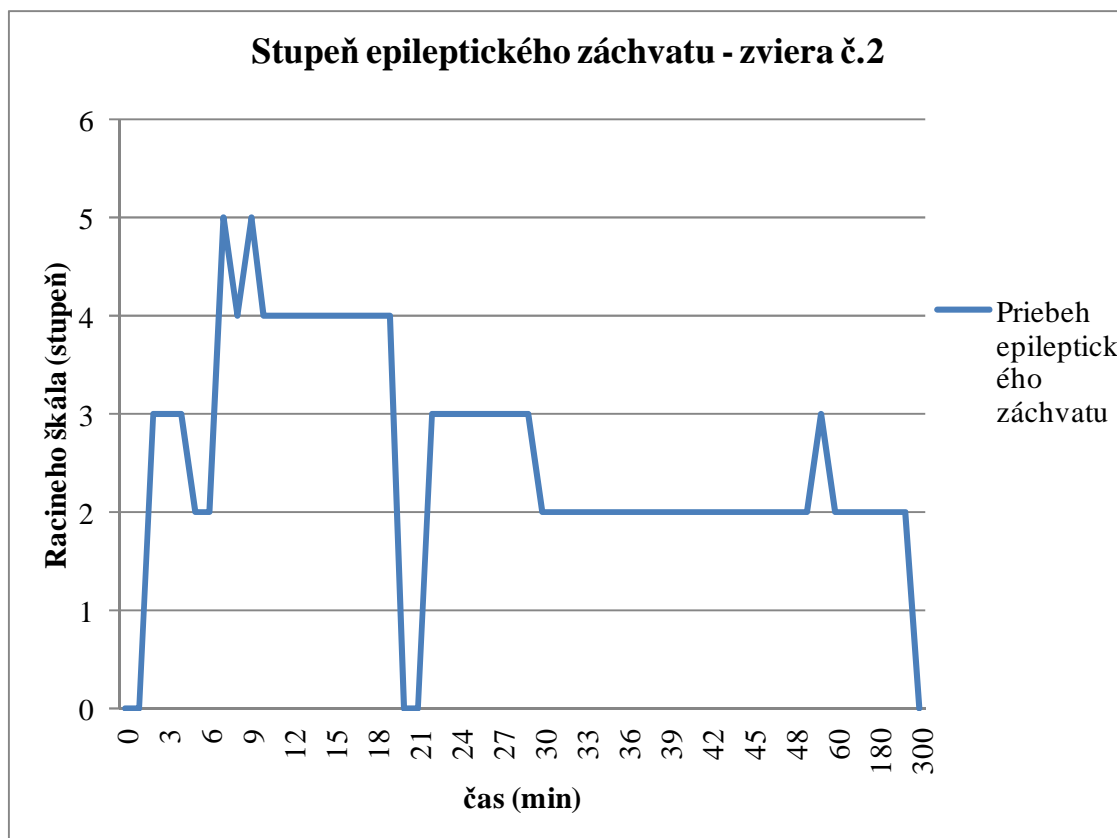
Zvierat'u č. 1 bol aplikovaný L-NPA 10 minút pred podaním 4-AP (unilaterálne 5 μ l). Vzhľadom na použitie menšieho množstvo, než pri ostatných skúmaných zvieratách boli prejavy epileptického záchvatu miernejšie až minimálne, s celkovým kratším trvaním. Doba nástupu prvého spazmu bola 4 minúty po ukončení operačného procesu. Celková doba trvanie záchvatu bola 49 minút (tabuľka č. 1, tabuľka č. 2 – vid' prílohy). Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu je znázornený v tabuľke č. 1 a tabuľke č. 2 (vid' prílohy) a v grafe č. 1 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 435 g a po ukončení experimentu 425 g. Úbytok hmotnosti predstavuje 10 g.



Graf č. 1 – Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 1

5.1.2 Hodnotenie zvierat'a č. 2

Zvierat'u č. 2 bol aplikovaný L-NPA o množstve 0,4 μ l 10 minút pred podaním 4-AP v množstve 10 μ l do mozgovej komory. Priebeh epileptického záchvatu bol mierny. Od zvierat'a č. 1 mal horší priebeh, avšak ostatné 2 zvieratá mali síce celkovo kratšiu dobu, ale pravdepodobne z dôvodu extrémneho vyčerpania. Doba nástupu prvého spazmu bola 2 minúty po ukončení operačného procesu. Celková doba trvanie záchvatu bola 4 hodiny 54 minút (tabuľka č. 1, tabuľka č. 2 – vid' prílohy). Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu podľa Racine škály je znázornený v tabuľke č. 1 a tabuľke č. 2 (vid' prílohy) a v grafe č. 2 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 410 g a po ukončení experimentu 385 g. Úbytok hmotnosti predstavuje 25 g.



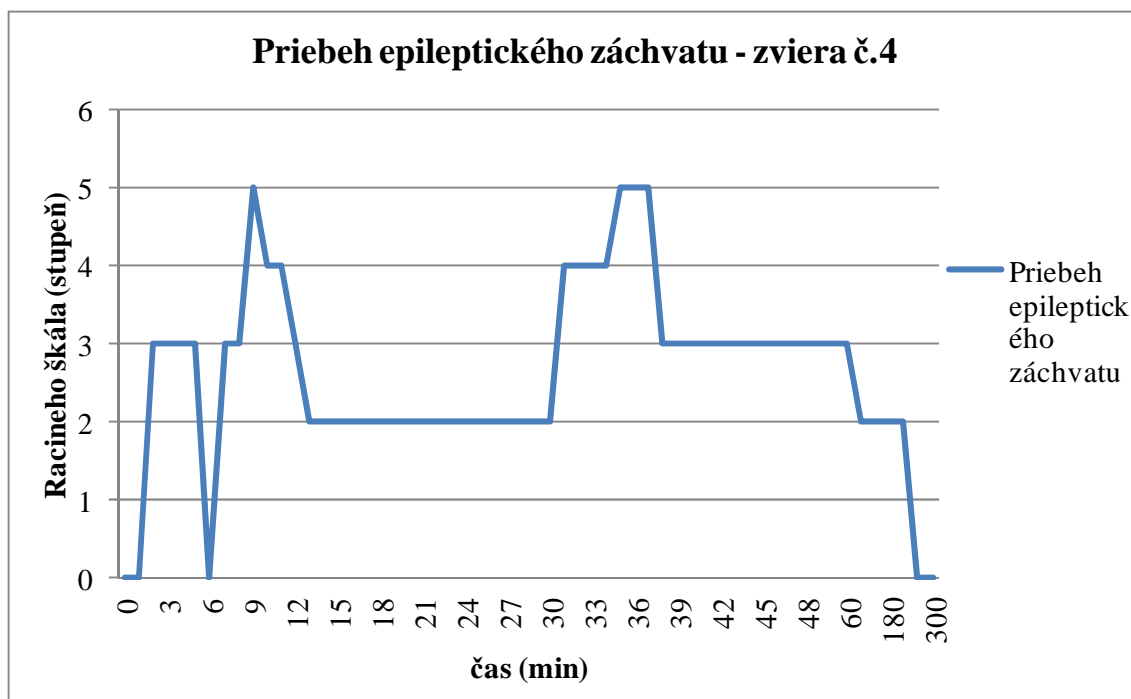
Graf č. 2 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 2

5.1.3 Hodnotenie zvierat'a č. 3

Zviera číslo 3 bolo usmrtené predčasne ešte pred aplikáciou skúmaných látok, z dôvodu predávkovania anestetikom. Z tohto nedostatku výsledných hodnôt bolo zviera vyradené z merania.

5.1.4 Hodnotenie zvierat'a č. 4

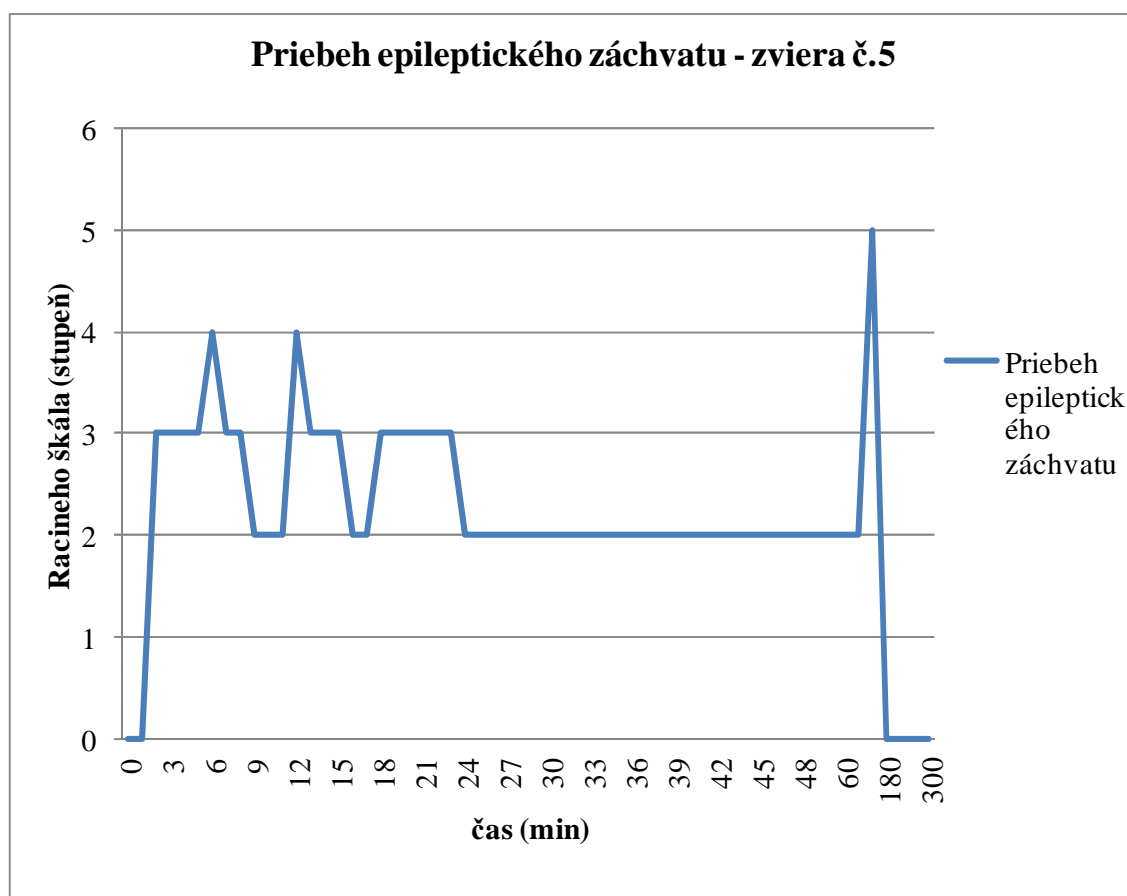
Zviera č. 4 malo najprv patriť do kontrolnej skupiny, avšak pre predčasné úmrtie predchádzajúceho zvierat'a bol zaradený do výskumnej skupiny. Z tohto dôvodu bol aplikovaný L-NPA taktiež v množstve 0,4 µl 10 minút pred podaním 4-AP v množstve 10 µl do mozgovej komory. Priebeh záchvatu bol agresívnejší než u zvierat'a č. 2. Okolo 33 minúty zviera až vyskakovalo z akvária, preto sme ho uzavreli aj zhora. Tento markantný záchvat ho pravdepodobne vyčerpal natoľko, že potom sa stav ustálil, zviera však len nevládne ležalo, takmer bez žiadnych reakcií a pohybu. Doba nástupu prvého spazmu bola 2 minúty po ukončení operačného procesu. Celková doba trvanie záchvatu bola 3 hodiny 12 minút. Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu podľa Racineho škály je znázornený v tabuľke č. 1 a tabuľke č. 2 (viď prílohy) a v grafe č. 3 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 430 g a po ukončení experimentu 390 g. Úbytok hmotnosti predstavuje 40 g. Zviera nasledujúci deň zomrelo.



Graf č. 3 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 4

5.1.5 Hodnotenie zvierat'a č. 5

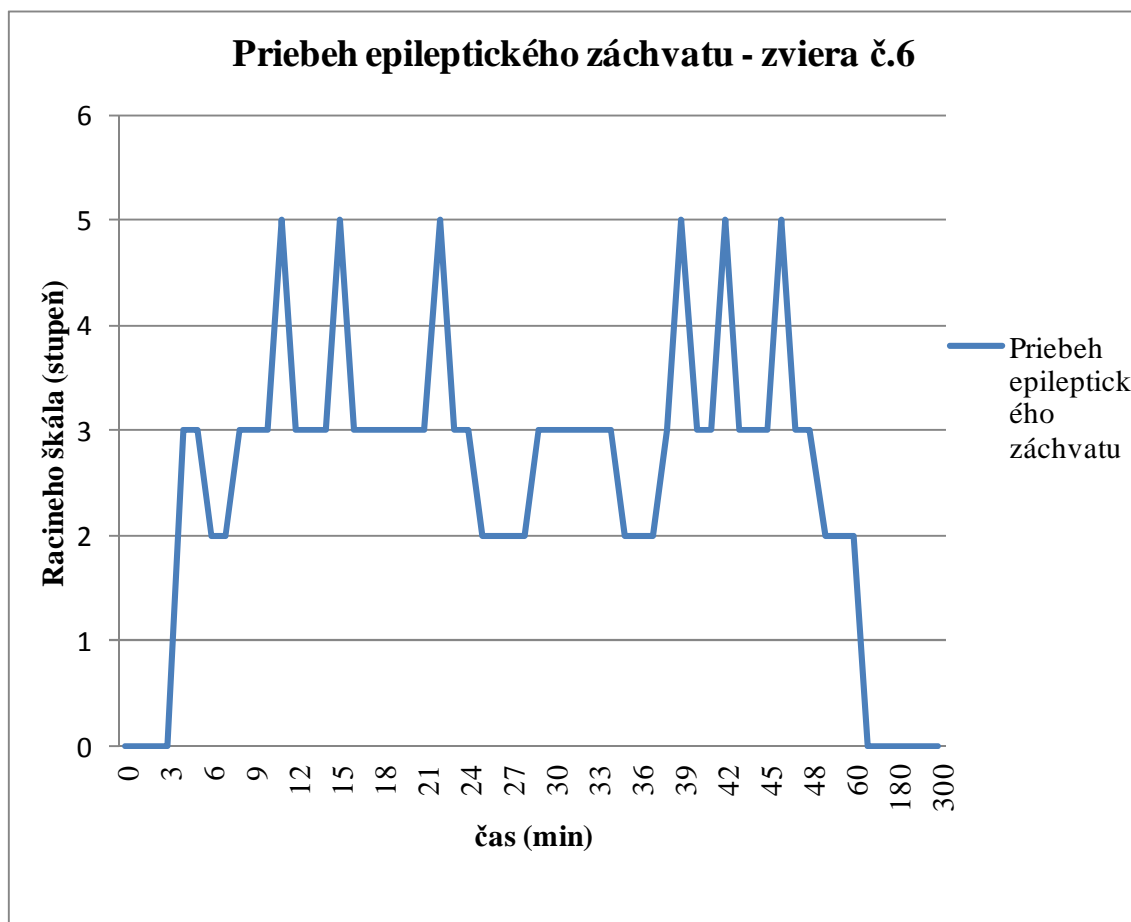
Zviera č. 5 patrí do kontrolnej skupiny. Preto bol aplikovaný L-NPA v množstve 0,4 μ l 10 minút pred podaním fyziologického roztoku v množstve 10 μ l. Prejavy i priebeh epileptického záchvatu boli podobné ako u zvierat'a č. 4. Avšak podľa tabuľky a grafov môžeme vidieť, že v porovnaní z predchádzajúcimi stupeň záchvatu nikdy nedosahoval hodnotu 0. Doba nástupu prvého spazmu bola 2 minúty po ukončení operačného procesu. Celková doba trvania záchvatu bola 2 hodiny 50 minút. Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu podľa Racineho je znázornený v tabuľke č. 3 a v tabuľke č. 4 (viď prílohy) a v grafe č. 4 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 435 g a po ukončení experimentu 410 g. Úbytok hmotnosti predstavuje 25 g.



Graf č. 4 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 5

5.1.6 Hodnotenie zvierat'a č. 6

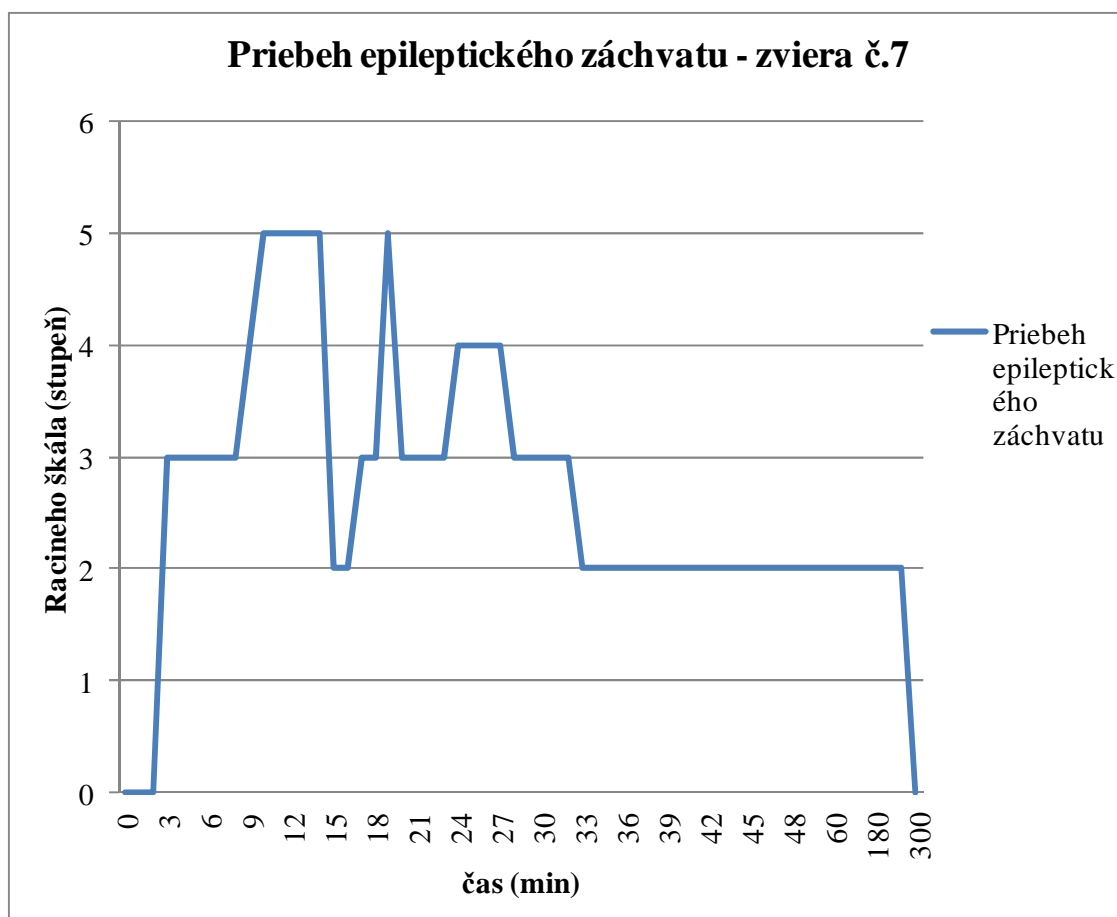
Zviera č. 6 patrí k výskumnej skupiny. Bol aplikovaný L-NPA v množstve 0,4 μ l 10 minút pred podaním 4-AP v množstve 10 μ l do mozgovej komory. Prejavy i priebeh epileptického záchvatu bol nestály, zviera dosahovalo často najvyššiu hodnotu avšak celkový čas od začiatku spazmov po ich ukončenie bol pomerne dosť krátky v porovnaní s ostatnými skúmanými skupinami. Podľa tabuľky a grafu môžeme vidieť, že intenzita bola premenlivá. Doba nástupu prvého spazmu bola 4 minúty po ukončení operačného procesu. Celková doba trvanie záchvatu bola 1 hodina 35 minút. Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu podľa Racineho škály je znázornený tabuľke č. 1 a tabuľke č. 2 (viď prílohy) a v grafe č. 5 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 460 g a po ukončení experimentu 455 g. Úbytok hmotnosti predstavuje 5 g.



Graf č. 5 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 6

5.1.7 Hodnotenie zvierat'a č. 7

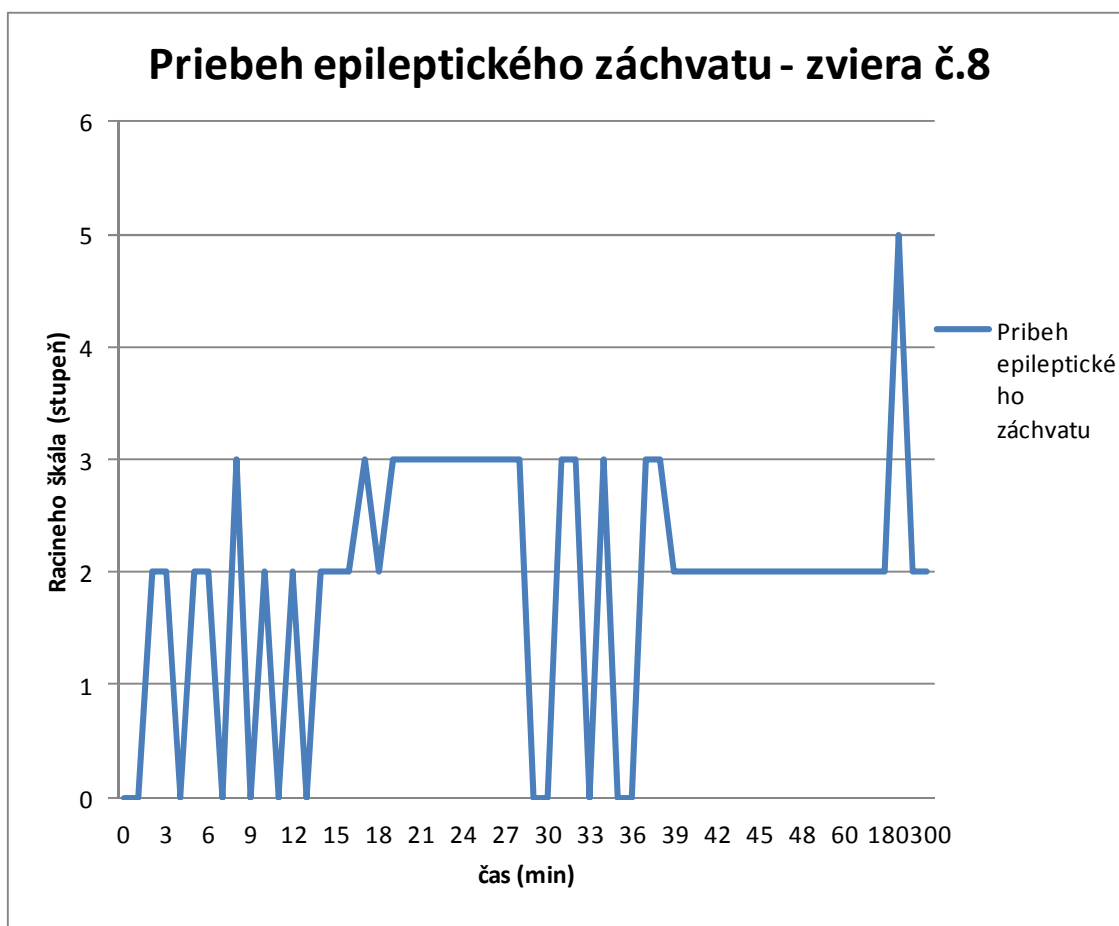
Zviera č. 6 patrí do výskumnej skupiny. Bol aplikovaný L-NPA v množstve 0,4 μ l 10 minút pred podaním 4-AP v množstve 10 μ l do mozgovej komory. Prejavy a priebeh bol spočiatku silnejší potom sa ustálili. Nástup prvého spazmu nasledoval tretiu minútu po ukončení operačného procesu. Celková doba trvania záchvatu bola 4 hodiny 40 minút. Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu podľa Racineho škály je znázornený v tabuľke č. 1 a tabuľke č. 2 (viď prílohy) a v grafe č. 6 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 442 g a po ukončení experimentu 414 g. Úbytok hmotnosti predstavuje 28 g.



Graf č. 6 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 7

5.1.8 Hodnotenie zvierat'a č. 8

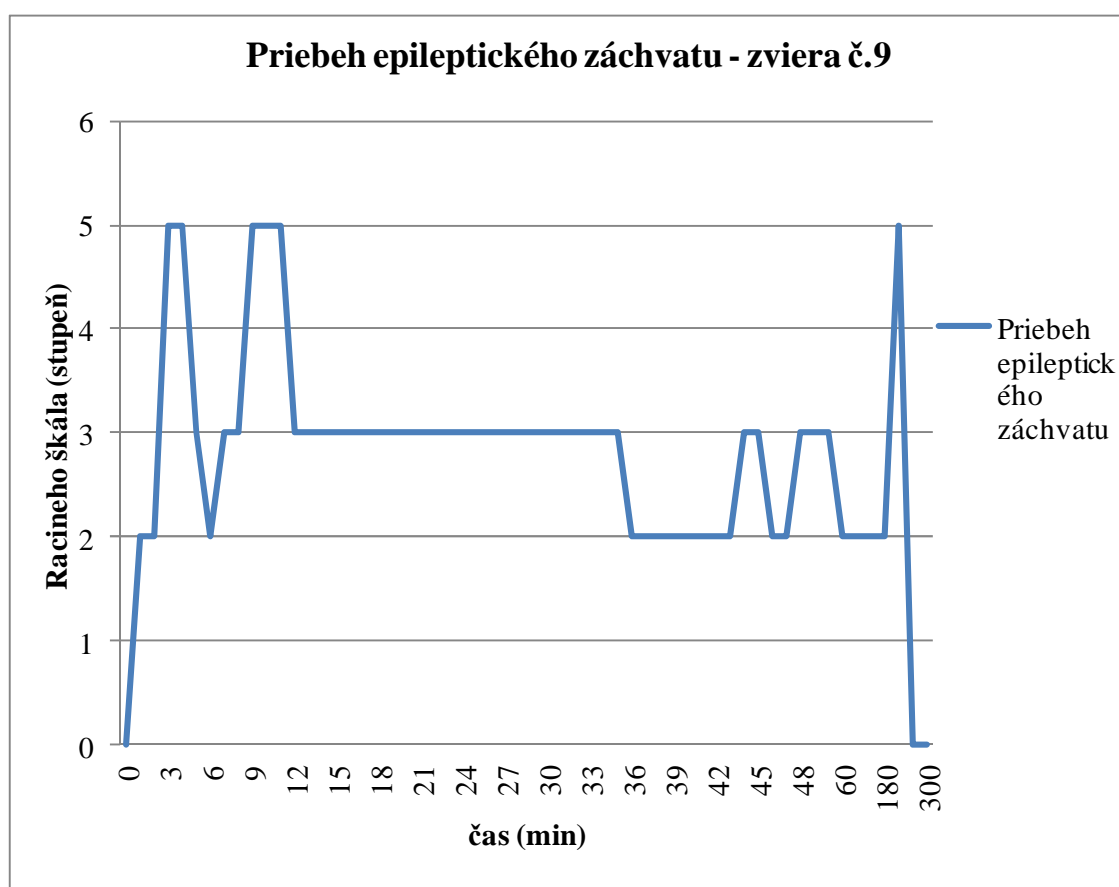
Zviera č. 8 patrí do výskumnej skupiny. Bol aplikovaný L-NPA v množstve 0,4 μ l 10 minút pred podaním 4-AP v množstve 10 μ l do mozgovej komory. Prejavu i priebeh epileptického záchvatu začínali pozvoľna striedajúc aktivitu s inaktivitou a cca od 20 minúty sa zväčšili, postupne sa mierne zmenšili až po 4 hodinách. Doba nástupu prvého spazmu bola 3 minúty po ukončení operačného procesu. Celková doba trvania záchvatu bola 5 hodín 10 minút. Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu podľa Racineho škály je znázornený v tabuľke č. 1 a v tabuľke č. 2 (viď prílohy) a v grafe č. 7 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 460 g a po ukončení experimentu 428 g. Úbytok hmotnosti predstavuje 32 g.



Graf č. 7 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 8

5.1.9 Hodnotenie zvierat'a č. 9

Zviera č. 9 patrí do kontrolnej skupiny. Bol aplikovaný L-NPA v množstve 0,4 μ l 10 minút pred podaním fyziologického roztoku v množstve 10 μ l do mozgovej komory. Prejavy a priebeh záchvatu bol zo začiatku a prudkým nástupom, následne ustálenie na hodnotu 2 a v cca 40 minúte bol záchvat vystupňovaný na najvyššiu možnú hodnotu. Zviera sme museli zavrieť v akváriu aj zhora z dôvodu extrémne prudkých spazmov (vyskakovania). Pravdepodobne z nedostatku síl prestalo toto zviera kľčovať a len voľne ležalo, bez výrazných reakcií na dotyk. Doba nástupu prvého spazmu bola 2 minúty po ukončení operačného procesu. Celková doba trvanie záchvatu bola 3 hodiny 45 minút. Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu podľa Racineho škály je znázornený v tabuľke č. 3 a tabuľke č. 4 (viď prílohy) a v grafe č. 8 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 455 g a po ukončení experimentu 426g. Úbytok hmotnosti predstavuje 29g.



Graf č. 8 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 9

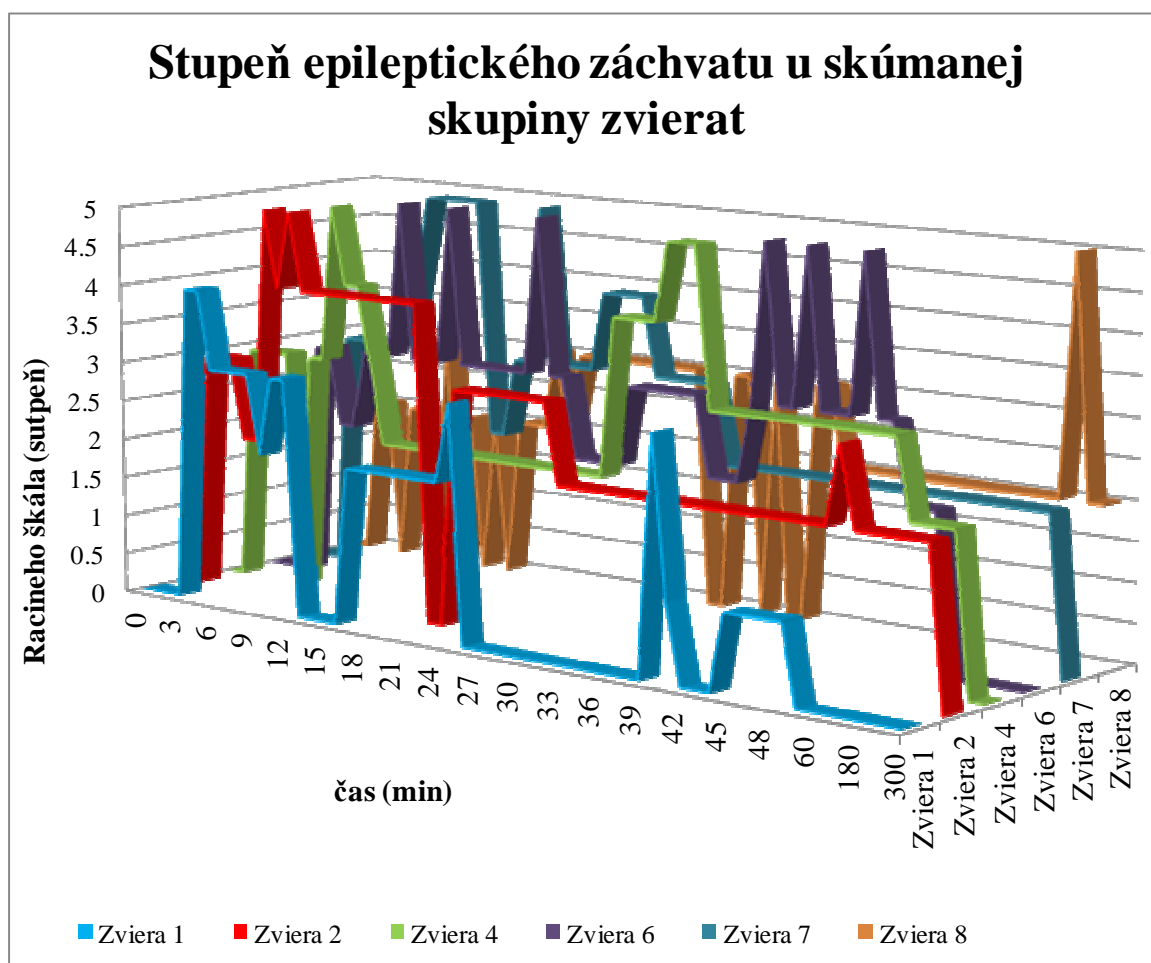
5.1.10 Hodnotenie zvierat'a č. 10

Zviera č. 10 patrí do kontrolnej skupiny. Bol aplikovaný L-NPA v množstve 0,4 µl 10 minút pred podaním fyziologického roztoku v množstve 10 µl do mozgovej komory. Priebeh a prejavy epileptického záchvatu sa postupne zvyšovali a svoj vrchol dosiahli v 40. minúte, kedy bolo zviera hádzané zo strany na stranu a skákalo všetkými smermi. Následne potom bez pohybu a reakcií ležalo. Doba nástupu prvého spazmu bola 1 minúta po ukončení operačného procesu. Celková doba trvanie záchvatu bola 3 hodiny 45 minút. Dosiahnutý stupeň a celkový priebeh epileptického záchvatu podľa Racineho škály je znázornený v tabuľke č. 3 a tabuľke č. 4 (viď prílohy) a v grafe č. 9 (pod textom). Na začiatku pozorovania bola váha zvierat'a 435 g a po ukončení experimentu 410 g. Úbytok hmotnosti predstavuje 25 g.



Graf č. 9 - Grafické znázornenie priebehu epileptického záchvatu u zvierat'a č. 10

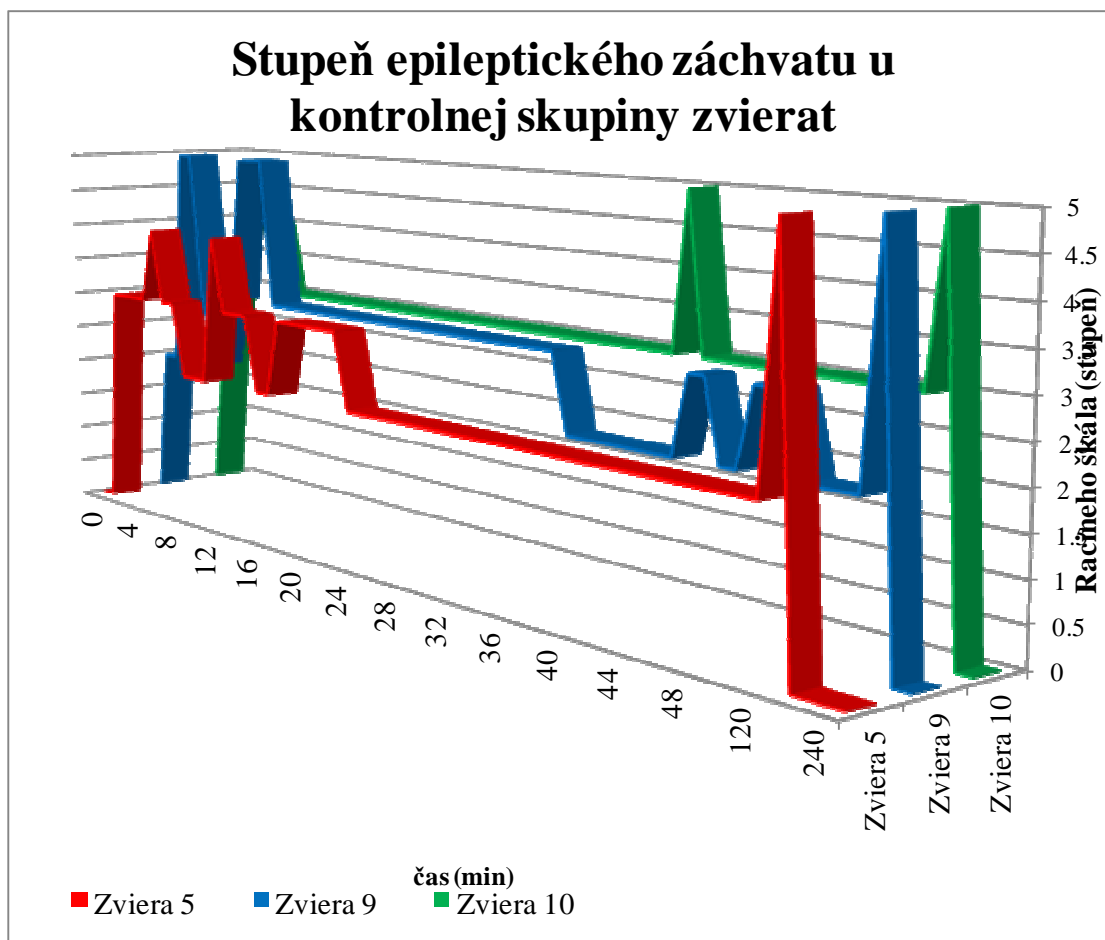
5.2 Porovnanie a zhodnotenie priebehu epileptického záchvatu kompletnej skúmanej skupiny s kontrolným súborom zvierat



Graf č. 10 – Porovnanie stupňa epileptického záchvatu podľa Racineho škály u všetkých zvierat zo skúmanej skupiny

Všetky zvieratá patriace do skúmanej skupiny sú porovnané súborne v grafe č. 10 (viď vyššie). Zvieratá boli porovnané na základe Racineho škály, ktorá pozostáva z piatich stupňov:

- 1.stupeň – Pohyby ústami a tváre
- 2.stupeň – Prikyvovanie hlavou
- 3.stupeň – Klonus končatín
- 4.stupeň – Šplhanie/ lezenie
- 5.stupeň – Šplhanie/ lezenie a pád



Graf č. 11 - Porovnanie stupňa epileptického záchvatu podľa Racineho škály u všetkých zvierat z kontrolnej skupiny

Tieto stupne určujú intenzitu záchvatu od najslabšej označenej stupňom 1 až po najsilnejšiu (stupeň 5). Slúži na zobjektívnenie a možnosť porovnať záchvaty u potkanov.

Najvyšší stupeň v skúmanej skupine nedosiahlo len jedno zviera – č. 1, ktoré malo taktiež celý priebeh epileptického záchvatu najslabší. Najintenzívnejší záchvat môžeme vidieť u zvieraťa 6, ktoré dosiahlo viac krát stupeň 5. Zviera 4 a 8 umreli v priebehu nasledujúcich dní.

Celkové porovnanie kontrolnej skupiny je znázornené v grafe č. 11 (viď vyššie). Každé zviera dosiahlo najvyšší stupeň. Zvieratá mali najsilnejší priebeh tesne pred koncom záchvatu. Ich ukončenie záchvatu však bolo pravdepodobne dané ich maximálnym vyčerpaním. Po prekonaní najsilnejších spazmov tieto zvieratá neboli

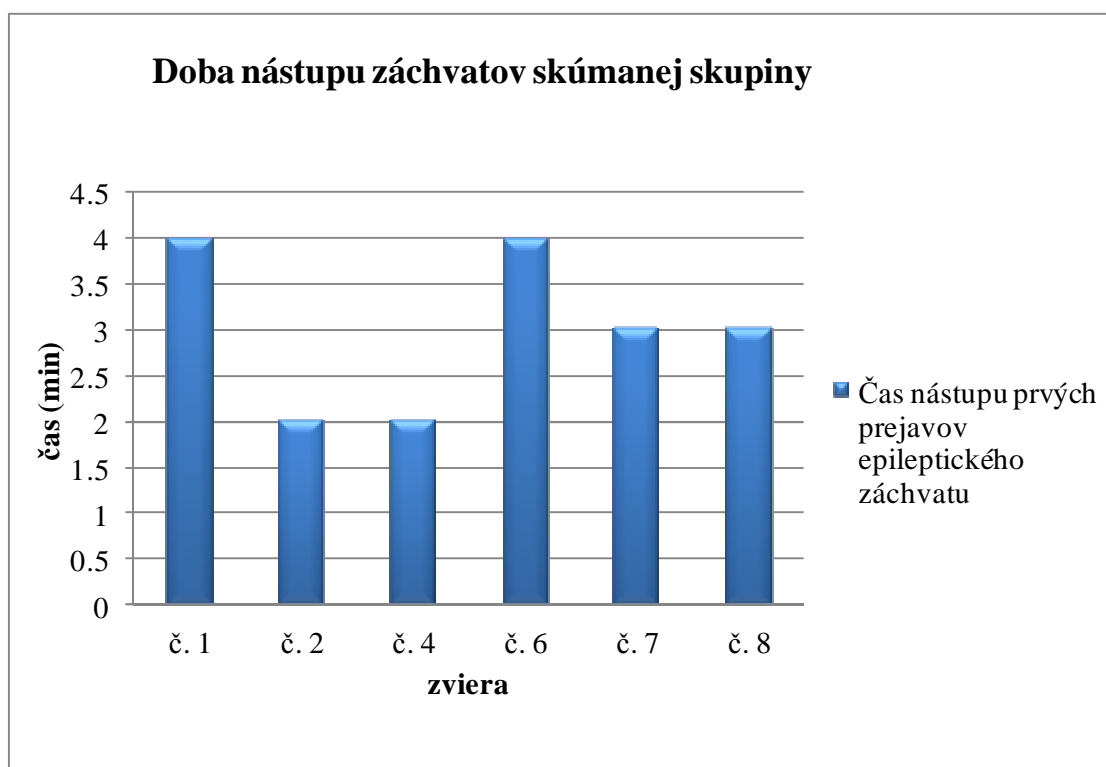
schopné dostatočne reagovať na vonkajšie podnety. Ležali takmer bez pohybu. Do niekoľkých dní po záchvate boli zvieratá mŕtve.

Pred aj po operačnom zákroku bolo každé zviera zvažované ako v skúmanej skupine zvierat, tak aj v kontrolnom súbore.

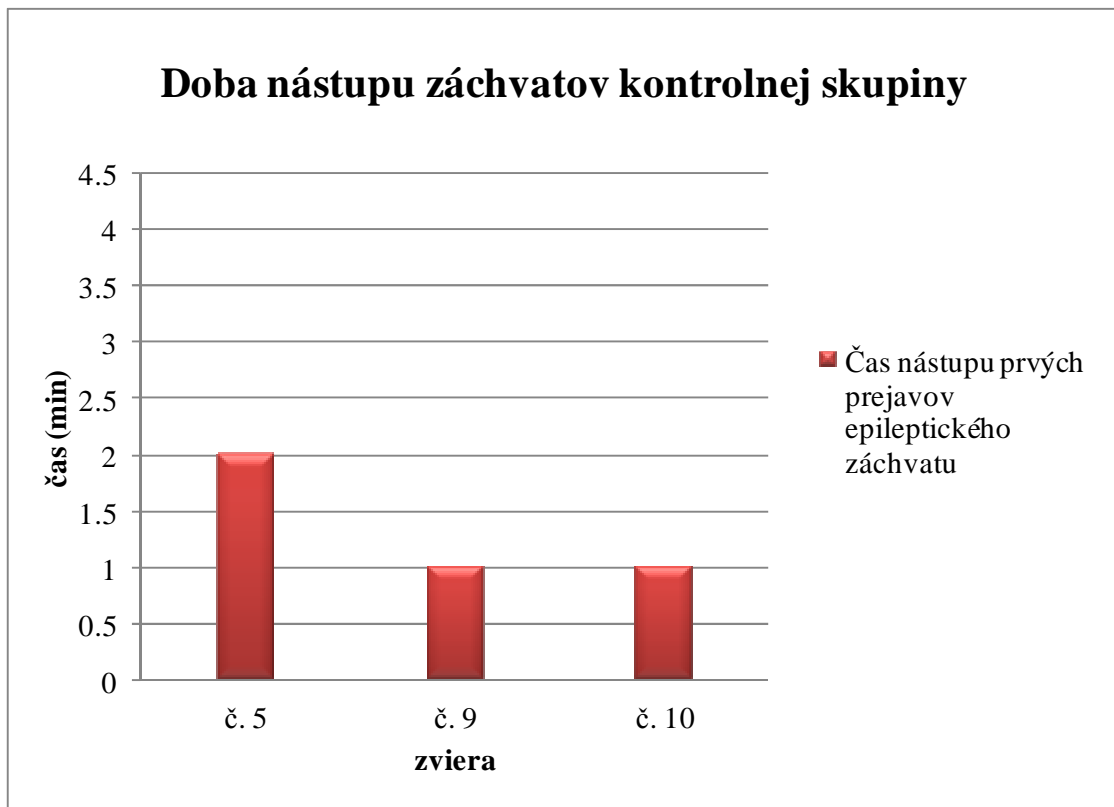
5.3 Hodnotenie doby nástupu prejavov epileptického záchvatu u oboch skupín

Doba nástupu skúmanej skupiny je zobrazená v grafe č. 12. Dvomi zvieratám (č.1, č.6) začali prvé spazmy 4 minúty po ukončení operačného procesu. Ďalšie 2 zvieratá (č.7, č.8) mali nástup počiatočných spazmov 3 minúty po ukončení operačného procesu. Dvomi zvyšným zvieratám (č.2, č.4) začali spazmy 2 minúty po ukončení operačného procesu. Zvieratá č.2 a č.4 sa dostali druhú minútu do veľkého spazmu a následne cca minútu len bez pohybu ležali a na rozdiel od ostatných mali naďalej hlboké dýchanie, až následne začali kŕče spojené s plytkým, rýchlym dýchaním.

Celkové výsledky doby nástupu kontrolnej skupiny zvierat sa nachádzajú v grafickej podobe v grafe č. 13. Zvieratá č. 5 mali začiatok nástupu epileptického záchvatu 2 minúty po operačnom procese. Prvé spazmy zvierat č. 9 a č. 10 nastali 1 minútu po ukončení operačného procesu.



Graf č. 12 – Porovnanie doby nástupu prvých záchvatov u zvierat zo skúmanej skupiny



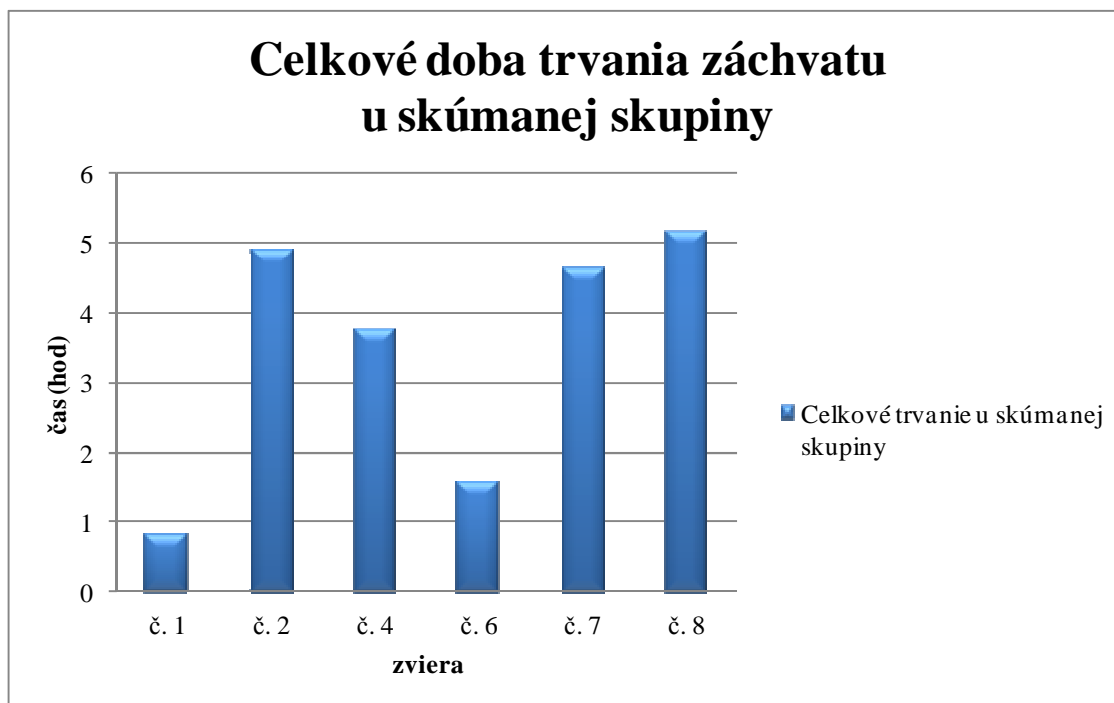
Graf č. 13 - Porovnanie doby nástupu prvých záchvatov u zvierat z kontrolnej skupiny

5.4 Hodnotenie celkového trvania záchvatu u oboch skupín

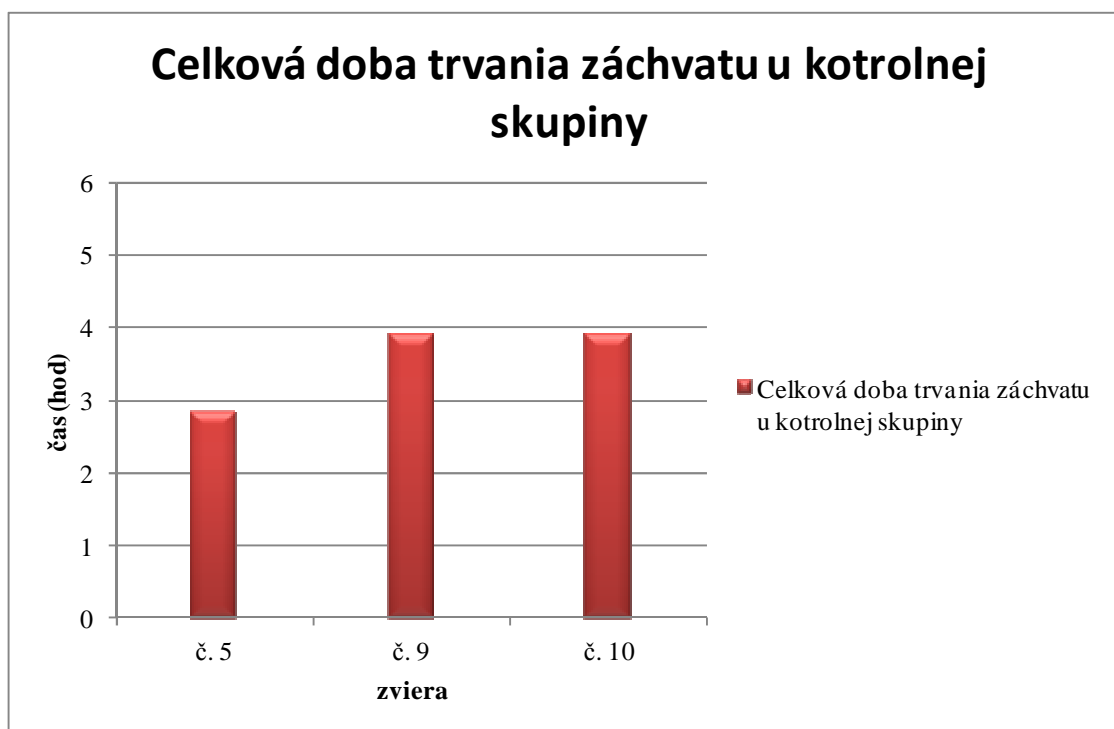
Celkové trvanie epileptického záchvatu bolo veľmi variabilné. Znázornené je graficky pre skúmanú skupinu zvierat v grafe č. 14 a pre kontrolnú skupinu zvierat v grafe č. 15. Skúmaná skupina mala celkovú dobu trvania od 49 minút až po 5 hodín 10 minút. Každé zviera malo rozdielne trvanie, ani v jednom prípade nebola zhoda. Prvé zviera malo o polovicu menšiu dávku než ostatné. Pravdepodobne z tohto dôvodu u neho epileptický záchvat skončil už po 49 minútach.

Kontrolná skupina má približne rovnakú dobu trvania pre každé zviera v rozmedzí 2 hodiny 50 minút - 3 hodiny 45 minút.

Ak porovnávame tieto dve skupiny zvierat zistíme, že kontrolná skupina mala priemerne kratší celkový čas trvania záchvatu avšak dôvodom môže byť práve ich prílišné vyčerpanie. Následne po ukončení spazmov epileptického záchvatu len ležali bez výrazného pohybu a reakcií na dotyk, či vonkajšie podnety. V skúmanej skupine sa zvieratá vo väčšine po záchvate pohybovali a reagovali na externé podnety primerane.



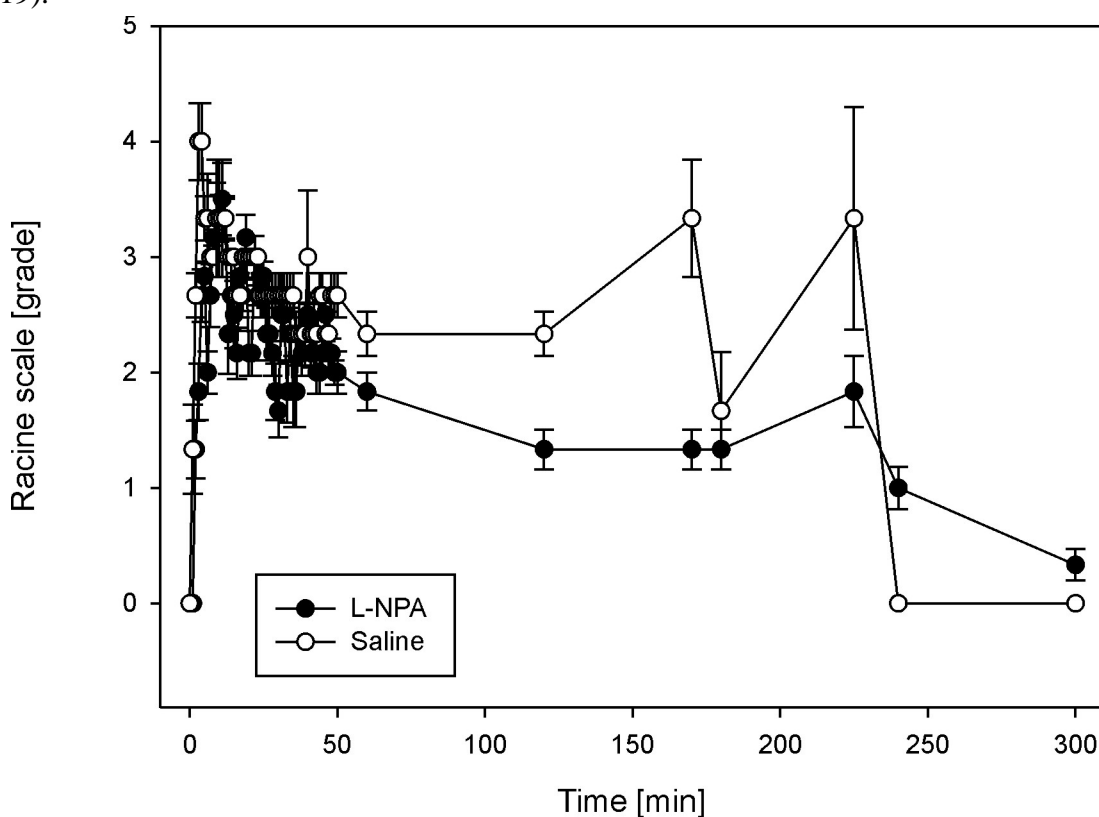
Graf č. 14 – Porovnanie celkovej doby trvania epileptického záchvatu u jednotlivých zvierat zo skúmanej skupiny



Graf č. 15 - Porovnanie celkovej doby trvania epileptického záchvatu u jednotlivých zvierat z kontrolnej skupiny

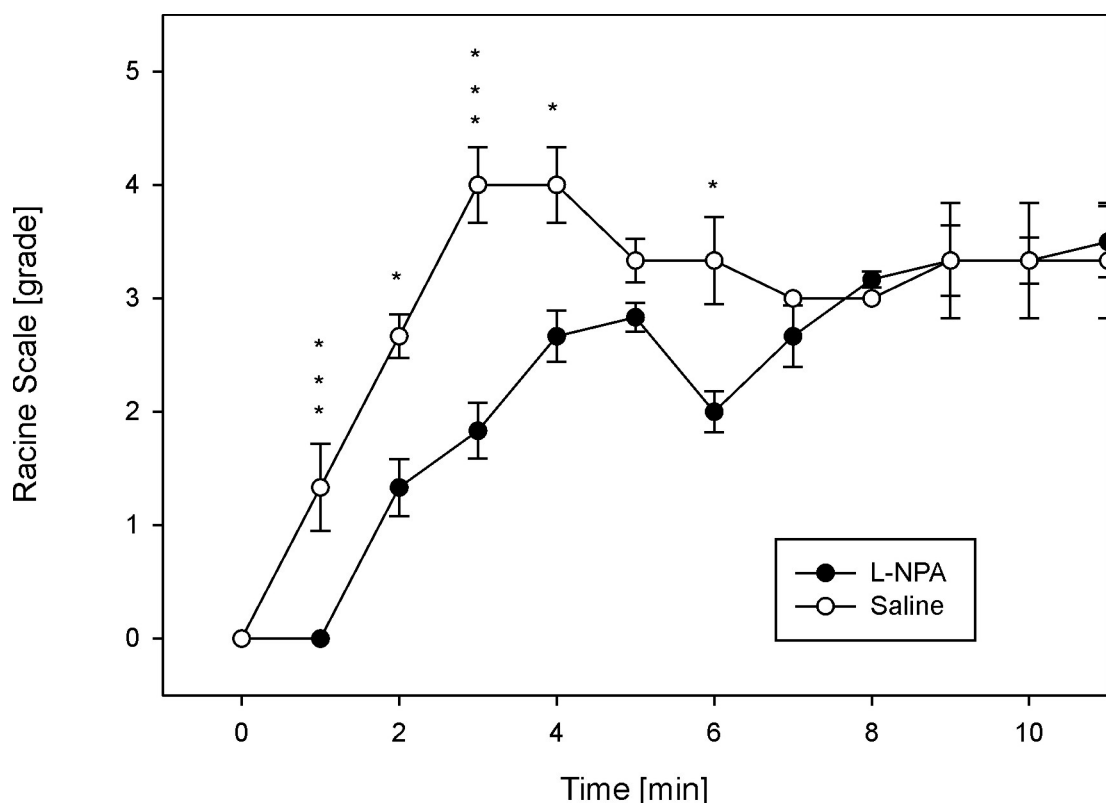
5.5 Štatistické porovnanie skúmanej a kontrolnej skupiny zvierat

Na porovnanie dvoch skupín zvierat sme použili T-test, ktorý zrovnáva strednú hodnotu stupňa epileptického záchvatu podľa Racineho škály u skúmanej skupiny s kontrolnou skupinou. Na grafe č. 16 môžeme vidieť porovnanie priebehu oboch skupín. Prehľadnejšie zhodnotenie môžeme vidieť na čiastkových grafoch (graf. č. 17 – 19).



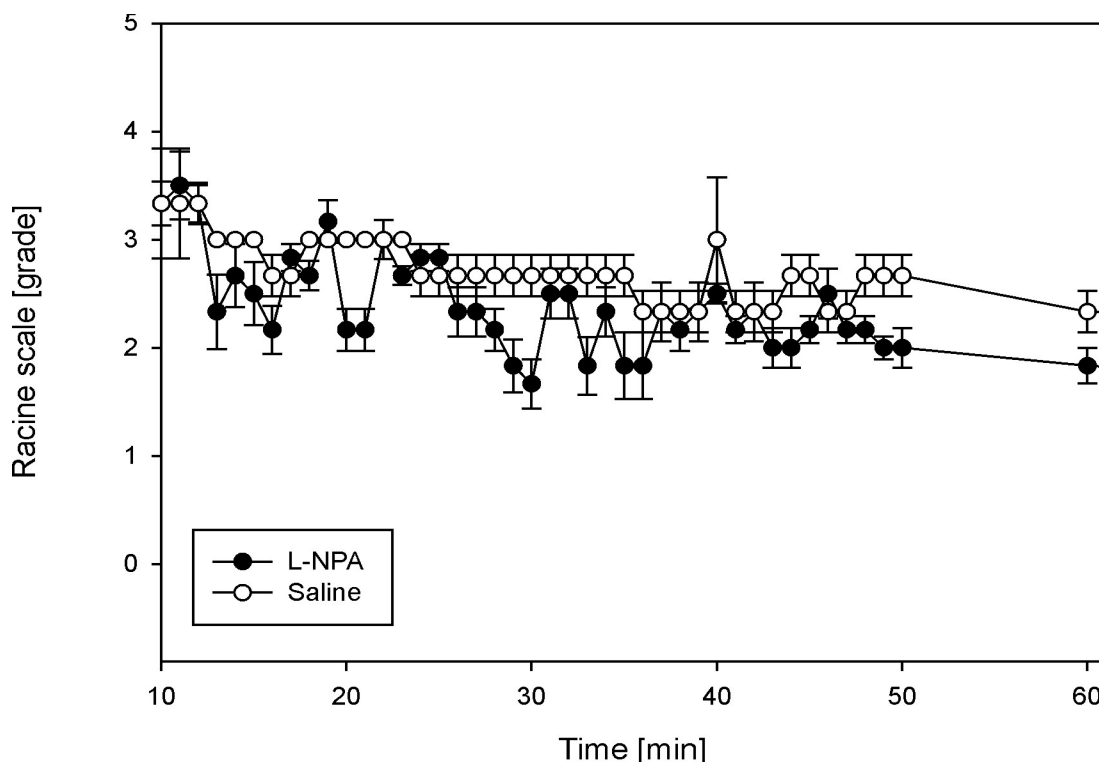
graf č. 16 – Celkové porovnanie stupňa záchvatu skúmanej skupiny s kontrolnou

V počiatočných siedmych minútach boli rozdiely dosť markantné a to konkrétne najmä v prvej a tretej minúte ako môžeme vidieť podľa označenej štatistickej signifikancie na grafe č. 17 - ***. Preukázala sa však mierna štatistická signifikancia aj v druhej, v štvrtej a v šiestej minúte. Môžeme vidieť, že doba nástupu prvého záchvatu sa pomocou aplikácie L-NPA oddialila priemerne o minútu. Taktiež stupeň záchvatu hodnotený Racineho škálou u kontrolnej skupiny mal rýchly nástup na vysoké hodnoty. Skúmaná skupina mala počiatočné minúty priebehu epileptického záchvatu pomalší a celkovo plynulejší.



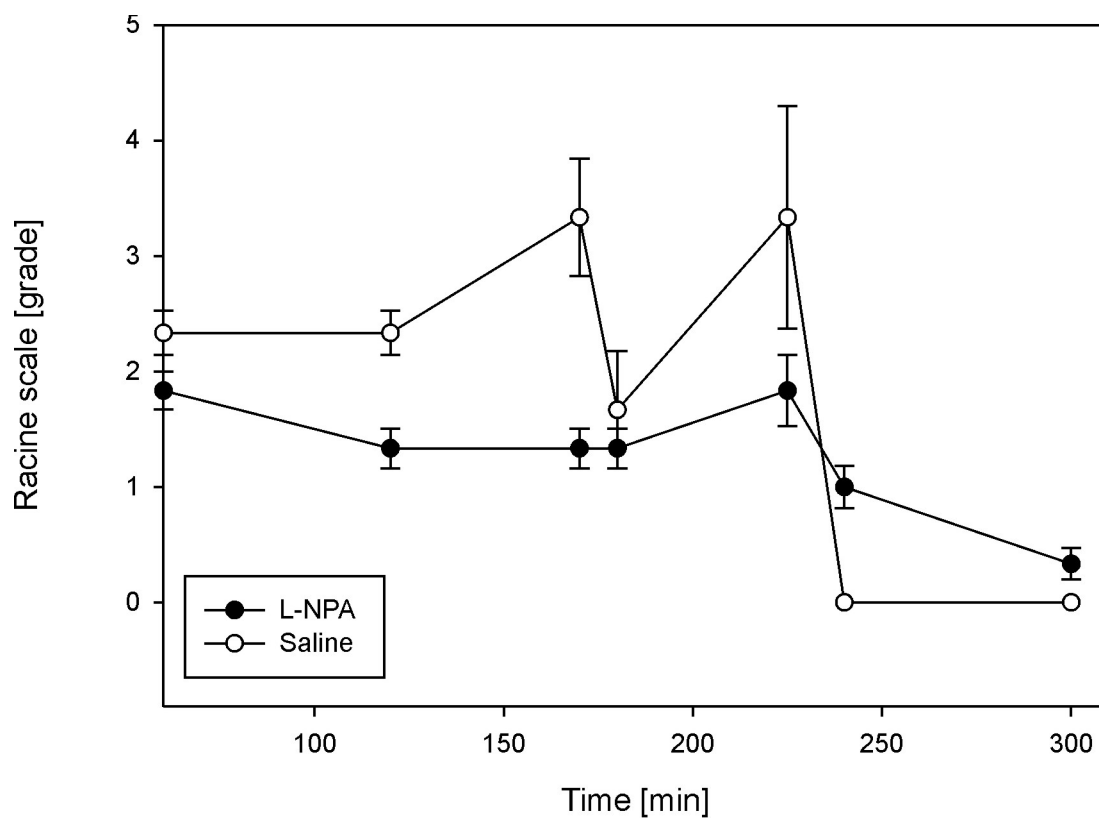
Graf č. 17 – Porovnanie dosiahnutého stupňa epileptického záchvatu u oboch skupín hodnotením Racineho škálou po dobu prvých 10 minút

Ďalší graf (graf č. 18) znázorňuje priebeh epileptického záchvatu v porovnaní oboch skupín od desiatej minúty po jednu hodinu. Môžeme vidieť, že obe skupiny dosahovali približne podobné priemerné hodnoty na stupnici Racineho škály. Dosiahnuté hodnoty boli zaznamenané v rozmedzí od cca 1,5 po 3,9. Výraznejšie rozdiely nachádzame v dvadsiatej, v tridsiatej a v štyridsiatej minúte priebehu epileptického záchvatu. Skupina s aplikovaným L-NPA dosahovala v porovnaní s kontrolnou skupinou celkovo nižšie priemerne hodnoty vo väčšine prípadoch. Preto celkovo efekt L-NPA môže byť hodnotený za pozitívny počas celej prvej hodiny.



Graf č. 18 - Porovnanie dosiahnutého stupňa epileptického záchvatu u oboch skupín hodnotením Racineho škálou po dobu 10 min – 60 min

Posledná fáza epileptického záchvatu je popísaná v nasledujúcom grafe (graf č. 19). Kde môžeme vidieť výrazný rozdiel. Kontrolná skupina k záveru dosahovala najvyššie možné hodnoty. Zvieratá boli počas záchvatu hádzané zo strany na stranu a zhora na dol. Následne došlo k ich maximálnemu vyčerpaniu čo spôsobilo na grafe hodnotu 0. Avšak ani jedno zviera nereagovalo primerane na externé podnety. Všetky zvieratá s kontrolnej skupiny ležali takmer bez pohybu. V priebehu nasledujúcich dní nastalo úmrtie. Zatiaľ čo skúmaná skupina s aplikovaným L-NPA mala priemerne stabilný priebeh zväčša s klesajúcou tendenciou epileptického záchvatu. Zo šiestich zvierat bolo prítomné úmrtie u dvoch v priebehu nasledujúcich dní.



Graf č. 19 - Porovnanie dosiahnutého stupňa epileptického záchvatu u oboch skupín hodnoteným Racineho škálou po dobu 1 hod – 5 hod

6 Diskusia

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť efekt inhibície NO aplikovaním L-NPA jednej skupine potkanov a porovnaním s kontrolnou skupinou, ktorej bol podaný fyziologický roztok. Tým potvrdenie alebo vyvrátenie zadaných hypotéz, ktoré boli stanovené na základe teoretického podkladu a štúdií spomenutých nižšie v tejto kapitole.

Priebeh experimentu

Aplikácia 4-AP spôsobila u všetkých potkanov status epilepticus (Perreault, Avoli, 1991), kde priebeh tohto epileptického stavu bol hodnotený Racineho škálou (Lüttjohann et al., 2009). Hodnotenie je vo výsledkoch zobrazené v grafoch, ktoré pozostávajú z dvoch premenných – „x“ (čas v minútach) a „y“ (Racineho škála v stupňoch). Zvieratá dosahovali v priebehu celých 5 hodín všetky hodnoty od 0-5 stupňov. Len zviera č. 1 nedosiahlo počas celého epileptického záchvatu prítomnosť hodnoty 5, práve pre unilaterálnu aplikáciu a polovicu dávky 4-AP.

Počas priebehu experimentu mohli tiež nastať chyby na základe ktorých mohli byť výsledky mierne skreslené. Aplikácia 4-AP a L-NPA mohla byť neúplná v dôsledku vzduchových bublín vzniknutých vo vedení cez systém hadičiek do mozgovej komory. Pri porovnávaní by bolo lepšie mať kontrolnú skupinu s rovnaký alebo väčším počtom než ako bol použitý. Vo väčšom počte by bolo hodnotenie každopádne viac objektívne. V skúmanej skupine o šiestich zvieratách bola aplikovaná len polovičnú dávku 4-AP prvému zviera, preto aj epileptický záchvat mal pomerne slabší celý priebeh. Ďalšie dve zvieratá v tomto súbore mali veľmi podobný priebeh a intenzitu epileptického záchvatu ako zvieratá z kontrolnej skupiny. Taktiež došlo aj k ich úmrtiu v nasledujúcich dňoch podobne ako v kontrolnom súbore. Práve z týchto dôvodov nie je úplná objektivita v meraní. V kontrolnej skupine sa spravil aritmetický priemer zo šiestich zvierat, z ktorých dve mali pomerne veľkú a porovnateľnú intenzitu a celý priebeh záchvatu ako všetky tri zvieratá v kontrolnom súbore. Tento priemer bol na druhej strane výrazne zmiernený prvým zvieraťom s polovičnou dávkou. Zviera č. 8 zo skúmanej skupiny malo taktiež slabší priebeh než bol pôvodne predpokladaný, pravdepodobne pre nedostatočnú aplikáciu. Práve preto mohol byť aritmetický priemer skreslený.

Avšak na druhej strane mohlo dôjsť aj k nedostatočnej aplikácii L-NPA dvom zvieratám (spomenutým vyššie), ktoré z toho dôvodu mohli mať silnejšiu intenzitu epileptického záchvatu.

Zhodnotenie hypotéz

Pomocou vzniknutých výsledkov môžeme stanoviť pozitivitu oboch hypotéz. To konkrétne dosiahnutiu rozdielov medzi skúmanou skupinou zvierat v porovnaní s kontrolným súborom, čo je zachytené v hypotéze 1. Ďalej som týmto experimentom potvrdila aj hypotézu 2 a z nej najmä celkové zmiernenie epileptického záchvatu, jeho priebehu, ako aj predĺženie intervalu medzi ukončením operačného procesu a prvými záchvatmi. Celková doba trvania však nie je ľahko preukázateľná. Kontrolná skupina zvierat dosahovala tesne pred ukončením záchvatu najvyššie možné hodnoty záchvatu hodnotené Racineho škálou, čo vyčerpalo zvieratá natoľko, že následne ležali takmer bez pohybu a bez výraznej reakcie na externé podnety.

Predpoklad mojich hypotéz vychádzal z ostatných doterajších štúdií. Napr:

V štúdií Utkana et al. (2012) skúmali vplyv inhibície nNOS pomocou L-NPA a iNOS na reguláciu učenia a pamäti pri potkanoch. Dokázali v rôznych druhoch úloh, že L-NPA pomocou inhibície nNOS negatívne vplyva na kognitívne funkcie. Môžeme teda predpokladať zvýšenú aktivitu nNOS pri zvýšenej činnosti a dráždivosti mozgu, ktorá nastáva aj pri epilepsií.

NO veľmi prispieva k synaptickej plasticite CNS, taktiež moduluje vo všetkých častiach mozgu uvoľňovanie niektorých neurotransmiterov ako je acetylcholín, katecholamíny, excitáciu a inhibíciu amino kyselín, serotonín, histamín a adenosín (Prast, Philippu, 2001). NO je tiež zapojený do množstva obvodov vedúcim k učeniu a pamäti (Susswein et al., 2004).

V štúdií Kaneko et al. (2002) mali za cieľ zistiť rolu NO v epileptogézií, kde vrast NO bol pozorovaný počas spazmov u potkanov, generované najmä počas tonickej fázy záchvatu. Použili taktiež inhibítory NO ako sú N(G)-nitro-L-arginine (L-NNA) , N(G)-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) a 3-bromo-7-nitroindazole (3Br-7NI). Čím potlačili spazmy, udržiavaním ich v tonickej fáze záchvatu. Pre každý druh inhibítory vznikli rôzne výsledky. S týmto experimentom súhlasia aj hypotézy stanovené na začiatku praktickej časti tejto diplomovej práce.

Kirby et al. (1996) taktiež dokazuje svojím experimentom na potkanoch, že inhibítor NOS (konkrétne N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester) oddiaľuje klonus v priebehu epileptického záchvatu. Čím bolo tiež dokázaný negatívny vplyv NOS v procese záchvatu. Čo tiež ako predchádzajúce výskumy prispieva k potvrdeniu stanovených hypotéz.

De Sarro et al. (1991) potvrdili svojím výskumom pozitívne účinky inhibície NOS. Použitím NG-monomethyl-L-arginine, čím poukazujú na to, že NO prispieva k vzniku záchvatovej aktivity.

Taktiež štúdia Przegaliński et al. (1996) svojím experimentom pozitívne potvrdili, že inhibítory NOS sú považované za antikonvulzívne látky vo vzťahu k záchvatom vyvolaným NMDA a ďalšími excitačnými aminokyselinami u myší.

V ďalších štúdiách ako u Matsumuru et al. (2008) môžeme tiež pozorovať porovnanie inhibítora nNOS s iNOS, kde je pozitívne hodnotený špecifický inhibítor nNOS (7-Nitroindazole). Z toho je možné uzavrieť, že najefektívnejšie bude použiť na potlačenie alebo aspoň spomalenie a oddialenie záchvatu práve len jeden zo špecifický inhibítor nNOS. Iné použité by nemuseli dosahovať efekt, ktorý mal byť experimentom v tejto diplomovej práci dosiahnutý.

Vo všetkých spomenutých štúdiách alebo výskumoch boli použité rôzne inhibítory NOS, rôzne množstvá a aj celkovo rozdielne metódy hodnotenia i porovnávanie. Na základe toho môžeme stanoviť, že pozitívnosť výsledkov v prospech inhibície nNOS závisí taktiež aj od dávky a pomeru látok L-NPA a 4-AP. Na dosiahnutie pravdepodobne výraznejších výsledkov by sme mohli použiť iný pomer spomínaných, použitých látok. Avšak na druhej strane, na príliš veľké množstvo 4-AP by nemusela stačiť menšia dávka L-NPA a zas pri použití podstatne väčšej dávky L-NPA by sa epileptický záchvat možno neprejavil a tak by boli výsledky ťažko zhodnotiteľné. Preto som čerpala z rôznych štúdií (spomínaných vyššie) a na základe toho stanovila použitú dávku.

Výsledky a celkový efekt, ktorý bol v tomto experimente dosiahnutý môžeme vidieť v tabuľke č. 5 a v tabuľke č. 6 (viď Prílohy), kde je znázornená zelenou farbou účinnosť L-NPA a ružová farba zaznamenáva neprítomnosť pozitívneho efektu inhibítora NOS. Hodnota celkového aritmetického priemeru pri porovnaní rozdielu skúmanej skupiny s kontrolným súborom zvierat je 0,43 počas prvých 60 minút

epileptického záchvatu v prospech L-NPA. To poukazuje na účinnosť inhibície nNOS. Znamená to, že je veľká pravdepodobnosť, že NO zohráva v epileptogenéze dôležitú úlohu. Spôsobuje vazodilatáciu ciev, aj tých ktoré sa nachádzajú v mozgu, čo podporuje neuronálnu činnosť v dôsledku dostatočnej výživy a energie na prenos vzruchov. Môžeme to vidieť aj na popise neurovaskulárneho couplingu – prepojenia neurovaskulárneho.

7 Záver

Touto diplomovou prácou som potvrdila hypotézy vzniknuté na základe teoretickej časti a skúmaných doteraz známych štúdií. Pri porovnaní celkových výsledkov skúmaného súboru zvierat s kontrolnou skupinou môžeme vidieť pozitívny efekt L-NPA na priebeh epileptického záchvatu. Bolo preukázane celkové zmiernenie a zníženie intenzity tohto záchvatu a oddialenie nástupu prvého spazmu. Celková doba trvania však nie je veľmi objektívne hodnotiteľná, z dôvodu prílišného vyčerpania zvierat patriacich do kontrolnej skupiny. Preto sa nedalo určiť, či záchvat ustal, alebo zviera nie schopné pohybu z veľkej straty energie.

Cieľ práce bol splnený a hypotézy potvrdené.

Použitá literatura

1. ADAMČOVÁ, H. et al. *Neurologie 2003*. Vyd. 1. V Praze: Triton, 2003, ISBN 80-725-4431-4.
2. ALDERTON, W. K., COOPER, CH. E., KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* [online]. 2001, roč. 357, č. 3, s. 593- [cit. 2012-04-18]. ISSN 02646021. DOI: 10.1042/0264-6021:3570593. Dostupné z: <<http://www.biochemj.org/bj/357/bj3570593.htm>>.
3. BRODIE M. J., SCHACHTER S. C., KWAN P. *Epilepsy*. 3rd ed. Oxford: Health Press, 2005. ISBN 19-037-3430-4.
4. DE SARRO, G.B., DONATO DI PAOLA, E., DE SARRO, A., VIDAL, M.J.: Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid-induced seizures from the deep prepiriform cortex. *Fundamental and clinical Pharmacology*. 1991, roč. 5, č. 6. ISSN 0767-3981.
5. DEDKOVA, U., RICHTER, Ch. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. *AJP: Cell Physiology* [online]. 2004-02-01, roč. 286, č. 2 [cit. 2011-03-21]. ISSN 0363-6143. Dostupné z: <<http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00155.2003>>.
6. DOLANSKÝ, J. *Současná epileptologie*. 1. vyd. Praha: TRITON, 2000, 164 s. ISBN 80-725-4101-3.
7. DUCHEN, M. R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine*. 2004, roč. 25, č. 4, s. 365-451. ISSN 0098-2997.
8. FÖRSTERMANN, U. et al. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* [online]. 2010, roč. 459, č. 6, s. 923-939 [cit. 2012-03-24]. ISSN 0031-6768. DOI: 10.1007/s00424-010-0808-2. Dostupné z: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00424-010-0808-2>>.

9. GHAFOURIFAR, P., RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Letters* [online]. 1997, roč. 418, č. 3, s. 291-296 [cit. 2011-11-05]. ISSN 00145793. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)01397-5. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579397013975>>.
10. GIULIVI, C. et al. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2003, roč. 34, č. 4, s. 397-408 [cit. 2012-04-24]. ISSN 08915849. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)01298-4. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584902012984>>.
11. GOW, A. J., CHEN, Q., GOLE, M., THEMISTOCLEOUS, M., LEE, V. M., ISCHIROPOULOS, H. Two distinct mechanisms of nitric oxide-mediated neuronal cell death show thiol dependency. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2000, roč. 278, č. 6. ISSN 0363-6143.
12. GRIFFITH, O. W., BABU, B. R. Mapping the active site of nitric oxide synthase. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*. 1999. ISSN 0302-2994.
13. IGNARRO, Louis J. *Nitric oxide: biology and pathobiology*. 1st ed. Překlad Zuzana Jungwirthová. San Diego: Academic Press, 2000, s. 1003. ISBN 01-237-0420-0.
14. IGNARRO, Louis J. *Program Ano NO: skutečný zachránce života; konec srdečním chorobám*. 1. vyd. Překlad Zuzana Jungwirthová. Praha: Práh, 2005, 197 s. ISBN 80-725-2113-6.
15. KANEKO, K. et al. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. *Magnetic Resonance in Medicine* [online]. 2002, roč. 48, č. 6, s. 1051-1056 [cit. 2012-04-10]. ISSN 0740-3194. DOI: 10.1002/mrm.10297. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.10297>>.
16. KEEFER, L. K. et al. Nitric oxide-releasing derivatives of biomedically important substrates *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* [online]. [cit. 2011-04-11]. ISSN 0302-2994.
17. KIRKBY, R. D. et al. Factors determining proconvulsant and anticonvulsant effects of inhibitors of nitric oxide synthase in rodents. *Epilepsy Research* [online]. 1996, roč. 24,

- č. 2, s. 91-100 [cit. 2012-04-24]. ISSN 09201211. DOI: 10.1016/0920-1211(96)00005-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0920121196000058>.
18. KRÁL, B. Inhalace oxidu dusnatého v terapii plicní hypertenze. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*. 1998, roč. 43, č. 7-8, ISSN 0457-4206.
 19. KUPKOVÁ, Z., BENEŠ, L. Chemical properties, Biological effects and methods of detection of nitric oxide. *Chemické listy*. 2004, č. 3. ISSN 0009-2770.
 20. LÜTTJOHANN, A., FABENE, P.F., VAN LUIJTELAAR, G. a revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology* [online]. 2009, roč. 98, č. 5, s. 579-586 [cit. 2012-02-19]. ISSN 00319384. DOI: 10.1016/j.physbeh.2009.09.005. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938409003047>>.
 21. MACKERT, B. M. et al. Neurovascular coupling analyzed non-invasively in the human brain. *NeuroReport* [online]. 2004, roč. 15, č. 1, s. 63-66 [cit. 2012-04-25]. ISSN 0959-4965. DOI: 10.1097/00001756-200401190-00013. Dostupné z: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>>.
 22. MARUNA, P. Oxid dusnatý v hypothalamo-hypofyzární regulaci – I. Fyziologie. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2006, č. 4. ISSN 1210-7921.
 23. MATSUMURA, N. et al. Activities of 7-Nitroindazole and 1-(2-(Trifluoromethylphenyl)-imidazole Independent of Neuronal Nitric-Oxide Synthase Inhibition J. Pharmacol. Exp. Ther. 2008. S. 357-362.
 24. METEA, M. R., NEWMAN, E. A. Glial Cells Dilate and Constrict Blood Vessels: a Mechanism of Neurovascular Coupling. *Journal of Neuroscience* [online]. 2006-03-15, roč. 26, č. 11, s. 2862-2870 [cit. 2011-04-15]. ISSN 0270-6474. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4048-05.2006. Dostupné z: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4048-05.2006>>.
 25. MRAOVITCH, S., SERCOMBE, R. *Neurophysiological basic of cerebral blood flow control: an introduction*. London: John Libbey, 1996. ISBN 08-619-6272-9.

26. MUNGRUE, I. N. et al. Neurovascular coupling analyzed non-invasively in the human brain. *NeuroReport* [online]. 2004, roč. 15, č. 1, s. 63-66 [cit. 2012-04-25]. ISSN 0959-4965. DOI: 10.1046/j.1365-201X.2003.01182.x. Dostupné z: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>>.
27. NEVŠÍMALOVÁ, S. et al. *Neurologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002, 367 s. ISBN 80-246-0502-3.
28. Mitochondrial Biogenesis in Mammals: The Role of Endogenous Nitric Oxide. [online]. [cit. 2012-04-26]. DOI: 10.1126/science.1079368. Dostupné z: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1079368>>.
29. PERREAULT, T., AVOLI, M. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. 1991, roč. 65, č. 4, s. 771-85. ISSN 0022-3077.
30. PACHER, P., BECKMAN, J. S., LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2007, roč. 87, č. 1, s. 316-424. ISSN 0031-9333.
31. PAŘÍZKOVÁ, R., ČERNÝ, V., DOSTÁL, P. Význam oxidu dusnatého u kriticky nemocných. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*. 1998, roč. 43, č. 7-8, ISSN 0457-4206.
32. PASLEY, B. N., R. D. FREEMAN. Neurovascular coupling. *Scholarpedia* [online]. 2008(3) [cit. 2012-01-20]. Dostupné z: <http://www.scholarpedia.org/article/Neurovascular_coupling>.
33. PFEIFFER, J. *Neurologie v rehabilitaci: pro studium a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, 350 s. ISBN 978-802-4711-355.
34. PITKÄNEN, A., SCHWARTZKROIN P. A., MOSHÉ S. L. *Models of seizures and epilepsy: pro studium a praxi*. 1. vyd. Amsterdam: Elsevier Academic, 2006, 350 s. ISBN 978-012-0885-541.
35. PRAST, H., PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology* [online]. 2001, roč. 64, č. 1, s. 51-68 [cit. 2012-03-07]. ISSN 03010082.

- DOI: 10.1016/S0301-0082(00)00044-7. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008200000447>>.
36. PREGALINSKI, E., BARAN, L., SIWANOWICZ, J. The role of nitric oxide in chemically- and electrically-induced seizures in mice. *Neuroscience Letters* [online]. 2001, roč. 217, 2-3, s. 145-148 [cit. 2012-03-05]. ISSN 03043940. DOI: 10.1016/S0304-3940(96)13085-8. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394096130858>>.
37. SOUTHAN, G. J., SZABÓ, C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1996, roč. 51, č. 4, s. 383-394 [cit. 2012-04-21]. ISSN 00062952. DOI: 10.1016/0006-2952(95)02099-3. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295295020993>>.
38. STEINERT, J. R., CHERNOVA, T., FORSYTHE, I. D. Nitric Oxide Signaling in Brain Function, Dysfunction, and Dementia. *The Neuroscientist* [online]. 2010-09-03, roč. 16, č. 4, s. 435-452 [cit. 2012-04-15]. ISSN 1073-8584. DOI: 10.1177/1073858410366481. Dostupné z: <<http://nro.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1073858410366481>>.
39. SUSSWEIN, A. J. et al. Nitric Oxide and Memory. *The Neuroscientist* [online]. 2004-04-01, roč. 10, č. 2, s. 153-162 [cit. 2012-02-13]. ISSN 10738584. DOI: 10.1177/1073858403261226. Dostupné z: <<http://nro.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1073858403261226>>.
40. ŠIROKÁ, R. et al. Asymetrický dimerylarginin- nový rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění. *Vnitřní lékařství*. 2006, roč. 52, č. 3. ISSN 0042-773X.
41. VOJTĚCH, Z. *Epilepsie dospělých: [základní informace]*. Vyd. 1. Praha: TRITON, 2000, 59 s., Sv. 3. ISBN 80-725-4096-3.
42. WEBER, B. Neurovascular Coupling. *PhD Introductory Course* [online]. 2011 (Part II) [cit. 2012-01-20]. Dostupné z: <<http://www.neuroscience.ethz.ch/education/handouts/PhDIntroNeuroVascFS11handout.pdf>>.

Prílohy

Príloha č. 1: Potvrdenie etickej komisie

Príloha č. 2: Hodnotenie stupňa epileptického záchvatu u oboch skupín v tabuľkách

Príloha č. 1:

Tuto tabulku vyplňuje vedoucí pokusu (§ 18a odst. 2 písm. b) zákona č. 246/1992 Sb.):

PROJEKT POKUSŮ č. 70/2009

podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat

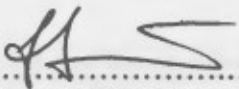
1.	Identifikace osoby provozující uživatelské zařízení:		
	Žadatel - název právnické osoby nebo jméno a příjmení fyzické osoby, která zařízení provozuje		
	FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, v.v.i.		
	IČ	67985823	RČH CZ11760005
	Adresa sídla nebo místa podnikání žadatele (včetně PSČ a okresu)		
	VÍDEŇSKÁ 1083, 142 20 PRAHA-4		
	Statutární orgán žadatele - jméno, příjmení, titul		
	RNDr. Jaroslav Kuneš, Dr.Sc.		
2.	Číslo rozhodnutí o udělení akreditace a doba jeho platnosti		
	36215/2008-10001, do prosince 2013		
3.	Vedoucí pokusu - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
	MUDr. Jakub Otáhal PhD; ČZU 410/00		
	Zástupce vedoucího pokusu (je-li ustanoven) - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
	Doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc; 0639/98 – M/17		
4.	Osoba odpovědná za péči o zvířata v uživatelském zařízení - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
	Ing. Vladimír Šmelhaus, 0025/95–M56		
5.	Osoba, která řídí činnost odborné komise uživatelského zařízení - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
	Doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc., 0639/98-M/17		
6.	Název úkolu studie, případně označení grantu		
	Úloha oxidu dusnatého v průběhu epileptických záchvatů a vzniku epilepsie		
7.	Charakteristika cílů studie s uvedením konkrétního očekávaného přínosu, včetně charakteristiky aplikovaných látek, nebo zařazení látek do indikačních skupin, s výjimkou výstupní kontroly šarží látek		
	Projekt je zaměřen na popis funkce oxidu dusnatého při epileptických záchvatech a rozvoji epilepsie. Oxid dusnatý v mozku hraje roli neuromodulátoru, účastní se regulace krevního průtoku mozku a účastní se zánětlivé reakce. Oxid dusnatý podle místa vzniku může působit protektivně, ale také může řadu patologií zhoršovat či dokonce způsobovat. Zvýšená produkce NO z indukibilní nitric oxid synthazy například po traumatech mozku vede ke kompetitivní blokádě dýchacího řetězce mitochondrie a progresu poškození nervové tkáně. V experimentech in vitro bylo dále zjištěno, že oxid dusnatý hraje významnou roli v inicializaci epileptických záchvatů. Řešním projektu bychom doplnili důležité znalosti, které napomohou k pochopení změn vedoucích k progresivní degeneraci nervové tkáně po epileptickém statu, ikto a epileptogenezi a přispějí k rozvoji specifických farmakologických strategií.		
8.	Podle § 15 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. bude pokus proveden za účelem (odpovídající zařazení označte křížkem (x) do prázdného políčka):		
	a) odvrácení nebo prevence nemocí, zdravotních poruch a jiných anomálií nebo jejich následků u člověka, zvířat nebo rostlin, včetně výroby a zkoušení jakosti, účinnosti a neškodnosti léčiv, látek nebo výrobků		
	b) provádění diagnostiky nebo léčby onemocnění, zdravotních poruch nebo jiných anomálií a jejich následků u člověka, zvířat nebo rostlin		
	c) zjišťování, vyhodnocování, řízení nebo modifikace fyziologických stavů u člověka, zvířat nebo rostlin		
	d) ochrany životního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí anebo zvířat		
	e) provádění výuky, pokud účelu nelze dosáhnout jinak		
	f) zachování nebo rozmnožování živého materiálu pro vědecké účely		
	g) provádění vědeckého výzkumu		x
	h) konání soudního řízení		
9.	Metodické postupy práce se zvířaty		


	<p>Celý projekt se dělí na tři samostatné pokusy.</p> <p>První akutní experiment bude probíhat se samci laboratorních potkanů (3měsíce). V celkové anestezii (urethan 1,2g/kg) budou implantovány stříbrné elektrody a elektrodová tyčka či tetroda umožňující EEG registraci (hipokampus, neocortex, entorhinální kortex) a elektrickou stimulaci sensorimotorické kůry. Kontralaterálně bude přiložena optická sonda LDF a Oxymetru pro měření mozkového průtoku a tkáňového kyslíku. Funkční zátěž bude vyvolána elektrickou stimulací sensorimotorické kůry (0.5-20Hz, 4s, 2-5mA). Epileptické záchvaty budou vyvolány aplikací (+) Bicuculinu (0,5mg/kg i.v.) kanylou zavedenou do vena jugularis v objemu cca 0,5ml.</p> <p>Druhý experiment bude prováděn opět s dospělými zvířaty. Po předchozí aplikaci LiCl bude aplikován pilokarpin (40mg/kg i.p.) pro vyvolání epileptického statu, který bude zastaven pomocí diazepam (4. mg/kg, i.p.) po 1 hodině. Ve stanovených časových intervalech budou v celkové inhalační anestezii (isoflurane) implantovány elektrody umožňující EEG registraci (hipokampus, neocortex, entorhinální kortex) a elektrickou stimulaci sensorimotorické kůry. Po chirurgickém zákroku bude zvířatům zajištěna pooperační péče tak, aby došlo k minimalizaci stresu a bolesti. Po 2-3 dnech regenerace budou zvířata nasazena na video/EEG monitoring a po 1dnu bude provedena zátěž elektrickou stimulací sensorimotorické kůry. Zvířata budou EEG monitorována 1-7dní. U vybraných časových intervalů bude prováděna opakovaná stimulace (1s, 60Hz/den) hipokampu po celou dobu monitoring.</p> <p>V obou in vivo experimentech bude využito farmakologické blokády nNOS pomocí specifických antagonist např. 7-nitro indazolu.</p> <p>Zvířata budou po experimentu uvedena do hluboké anestezie urethanem (2,5g/kg) a při zástavě dechu a v okamžiku zástavy dechu bude provedena transkardiální perfuze s použitím 4% paraformaldehydu a jejich mozek bude použit pro další histologickou analýzu. Část zvířat z každé skupiny (3-4) bude využito pro analýzu exprese isoformu NOS pomocí western blot. Zvířata budou anestetizována, mozek rychle vyňat z lebky a zamražen na -70st.C.</p> <p>Třetí experiment bude prováděn in vitro na akutních tkáňových řezech. Pro jejich přípravu se uvedou dospělí potkani do celkové anestezie etherem. Po rychlé dekapitaci gilotinou je mozek rychle vyjmut a krájen na vibratomu.</p>
10.	<p>Prohlášení navrhovatele o průkazu nezbytnosti pokusu nebo uvedení právního předpisu, který provedení pokusu ukládá, včetně zdůvodnění, proč nelze pokus na zvířeti nahradit alternativními metodami</p> <p>Navrhované studie spadají do oblasti základního lékařského výzkumu, který se zabývá patofyziologickými principy onemocnění centrálního nervového systému a jeho dynamikou. Studie je zaměřena na komplexní aspekty rozvoje epilepsie a epileptických záchvatů. Tyto experimenty nelze provádět jinak, než s použitím laboratorních zvířat.</p>
11.	<p>Zdůvodnění volby druhu, plemene, kmene a kategorie zvířat, jejichž využití je plánováno, s uvedením parametrů jejich kvality</p> <p>Laboratorní potkan představuje nejčastěji používaný živočišný druh pro plánovaný typ studie. Rovněž je dostupná celá řada údajů o vývoji, struktuře a funkcích mozku, které umožní výrazné snížení spotřeby experimentálních zvířat.</p>
12.	<p>Původ pokusných zvířat, s uvedením evidenčních údajů chovného a dodavatelského zařízení vč. RČH</p> <p>Fyziologický ústav AVČR Vítězská 1083 142 20 Praha 4 RČH: CZ 11760353 Číslo osvědčení: 36216/2008-10001</p>
13.	<p>Zdůvodnění počtů zvířat, jejichž využití je plánováno, za stanovené časové období</p> <p>V závislosti na charakteru pokusů budou jak v jednotlivých experimentálních tak v kontrolních skupinách použity 8-12 potkanů z důvodů statistického hodnocení pro elektrofyziologické experimenty. Celkový počet zvířat: 150 potkanů kmene Wistar/rok</p>
14.	<p>Způsob značení zvířat v pokusu</p> <p>Zvířata budou značena individuálně barevnými kódovými značkami fixem na ocasech a dále bude použito skupinové značení štítky na chovných nádobách. Tento systém značení umožní individuální sledování zvířat po celou dobu experimentu.</p>
15.	<p>Způsob znecitlivění, případně podání bolest utišujících prostředků nebo opatření ke snížení bolesti</p> <p>Veškeré bolestivé zásahy budou prováděny v celkové anestezii. Pro chirurgickou přípravu bude použito inhalační anestezie (isofluran, po úvodu bude anestezie udržována směsí s obsahem 1,5% isofluranu). Pro akutní fyziologické experimenty bude použita uretanová anestezie v dávce 1,2g/kg i.p.. Pro přípravu zvířat pro perfuzi bude použita uretanová anestezie (2-2,5 g/kg ip), která vede k zástavě dechu.</p>
16.	<p>Umístění zvířat během pokusu nebo u volně žijících zvířat místo pokusu</p> <p>Zvířata budou umístěna v akreditovaném příručním zvěřinci odd. 33, umístěném v přízemí budovy D (číslo dveří 022). Pokusy budou prováděny v prostorách oddělení 33, schválených pro práci se zvířaty.</p>
17.	<p>Časový plán jednotlivých fází pokusu na zvířatech, včetně data jeho ukončení</p> <p>Pokusy budou prováděny po dobu trvání grantu (1.1. 2010 – 31.12. 2012). Termín ukončení pokusu: 31.12.2012</p>
18.	<p>Úroveň operačního vybavení a způsob pooperační péče</p>

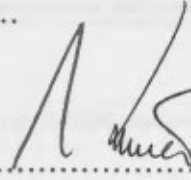
	Oddělení disponuje operační místností s veškerým nezbytným vybavením. Pooperační péče je poskytována standardním způsobem, tj. po zákroku jsou zvířata v případě potřeby rehydratována fyziologickým roztokem a dále je denně kontrolován jejich zdravotní stav a opakovaně i tělesná hmotnost. V příručním zvířeti je zajištěna pravidelná každodenní péče včetně víkendů a volných dní.			
19.	Způsob naložení se zvířaty po ukončení pokusu Usmrcení zvířete po dosažení výsledků pokusu bude provedeno předávkováním celkové anestezie před započítáním perfuze, nezbytné pro získání histologického materiálu. Kadaver bude uložen v kafilerním boxu v suterénu budovy G.			
20.	Způsob kontroly dodržování předpisů k ochraně zvířat Způsob a četnost kontrol stanovuje osoba zodpovědná za péči o zvířata v uživatelském zařízení a potvrzuje zápisem v protokolu pokusu.			
21.	Uvedení zdravotního rizika pro další zvířata a pro zaměstnance Při dodržování vnitřních předpisů o bezpečnosti práce z uvedeného pokusu mohou vyplývat pouze běžná rizika pro další zvířata a zaměstnance			
22.	Veterinární podmínky pokusu stanovené podle zvláštních právních předpisů Jsou stanoveny provozním řádem pracoviště			
23.	Zdůvodnění opakování zákroků na zvířatech (je-li s ním počítáno) Zárok se nebude opakovat.			
24.	Údaj o úrovni podmínek správné laboratorní praxe (je-li to požadováno zvláštními právními předpisy) Není požadováno			
25.	Stanovisko orgánu ochrany přírody v případě pokusu na jedincích druhů volně žijících zvířat (možno uvést a citovat jako přílohu)			
26.	Uživatelské zařízení, které předkládá projekt pokusů k jednorázovým odběrům od hospodářských zvířat a zvířat v zájmových chovech pro získání biologického materiálu k výrobě sér, očkovacích látek, diagnostik a léků, jej rozšíří o písemnou smlouvu s vlastníkem zvířete, od kterého se v takovém případě nevyžaduje osvědčení pro chovné zařízení (smlouvu uvést jako přílohu): <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Provádí uživatelské zařízení takové jednorázové odběry? (nehodící se vymažte)</td> <td>ANO</td> <td>NE</td> </tr> </table> Druh a množství materiálu určeného k odběru, doba jeho odběru, jeho metodika a způsob péče o zvíře po provedeném odběru, způsob seznámení majitele zvířete s těmito podmínkami a jejich kontrolou	Provádí uživatelské zařízení takové jednorázové odběry? (nehodící se vymažte)	ANO	NE
Provádí uživatelské zařízení takové jednorázové odběry? (nehodící se vymažte)	ANO	NE		

Projekt pokusů předkládá	MUDr. Jakub Otáhal, PhD
Telefon / Fax	24106 2495
E-mail	jotahal@epilepsy.biomed.cas.cz

Razítko uživatelského zařízení
Akademie věd ČR
FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV, v.v.i.
142 20 Praha 4-Krč, Vídeňská 1083
3

9.4.09 
Datum, podpis vedoucího pokusu

9.4.09 
Datum, podpis zástupce vedoucího pokusu

114 -04- 2009 
Datum, podpis statutárního orgánu žadatele

Tuto tabulku vyplňuje odborná komise uživatelského zařízení (§ 18b odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.):


STANOVISKO ODBORNÉ KOMISE UŽIVATELSKÉHO ZAŘÍZENÍ K PROJEKTU POKUSŮ č. 70/2009

souhlas

Členové odborné komise		Datum
Jméno	Podpis	
doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc.	<i>Hana Kubová</i>	14 -04- 2009
Ing. Josef Lachout, CSc.	<i>J. Lachout</i>	14 -04- 2009
Mgr. Andriy Lytvynets	<i>Andriy Lytvynets</i>	14 -04- 2009
PharmDr. Alena Sumová CSc.	<i>Alena Sumová</i>	14 -04- 2009
Ing. Vladimír Šmelhaus	<i>Vladimír Šmelhaus</i>	14 -04- 2009
MVDr. Ivan Štácha	<i>Ivan Štácha</i>	14 -04- 2009

Tuto tabulku vyplňuje příslušný státní orgán (§ 18b odst. 2, § 23 odst. 1 písm. a) zákona č. 246/1992 Sb.):

Nedílnou součástí tohoto projektu pokusů je povolení použití zvířat č.j.	70/2009 AUCO
Povolení bylo vydáno dne	16.4.2009
Razítko a podpis příslušného státního orgánu	<i>[Signature]</i>



Tuto tabulku vyplňuje vedoucí pokusu (§ 18a odst. 2 písm. c) zákona č. 246/1992 Sb.):

Schválení projektu pokusů oznámeno příslušnému orgánu veterinární správy dne	22 -04- 2009
Datum a podpis vedoucího pokusu	14.4.09 <i>[Signature]</i>

Tuto tabulku vyplňuje odborná komise uživatelského zařízení (§ 18 odst. 7 zákona č. 246/1992 Sb.):

Souhlas k zahájení pokusu udělen dne	14 -04- 2009
Datum a podpis člena odborné komise uživatelského zařízení	<i>Hana Kubová</i>

Príloha č. 2:

Tabuľka č. 1: Hodnotenie dosiahnutého stupňa počas prvých 30 minút priebehu epileptického záchvatu (Racineho škála) u skúmanej skupiny zvierat.

Čas (min)	Zviera č. 1	Zviera č. 2	Zviera č. 4	Zviera č. 6	Zviera č. 7	Zviera č. 8	Priemer	SEM
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	3	3	0	0	2	1,33333	0,25092
3	0	3	3	0	3	2	1,83333	0,24533
4	4	3	3	3	3	0	2,66667	0,22771
5	4	2	3	3	3	2	2,83333	0,12546
6	3	2	0	2	3	2	2	0,18257
7	3	5	3	2	3	0	2,66667	0,27217
8	3	4	3	3	3	3	3,16667	0,06804
9	3	5	5	3	4	0	3,33333	0,31032
10	2	4	4	3	5	2	3,33333	0,20184
11	3	4	4	5	5	0	3,5	0,3118
12	3	4	3	3	5	2	3,33333	0,17213
13	0	4	2	3	5	0	2,33333	0,34427
14	0	4	2	3	5	2	2,66667	0,29187
15	0	4	2	5	2	2	2,5	0,29345
16	0	4	2	3	2	2	2,16667	0,22153
17	2	4	2	3	3	3	2,83333	0,12546
18	2	4	2	3	3	2	2,66667	0,13608
19	2	4	2	3	5	3	3,16667	0,19484
20	2	0	2	3	3	3	2,16667	0,19484
21	2	0	2	3	3	3	2,16667	0,19484
22	2	3	2	5	3	3	3	0,18257
23	2	3	2	3	3	3	2,66667	0,08607
24	2	3	2	3	4	3	2,83333	0,12546
25	3	3	2	2	4	3	2,83333	0,12546
26	0	3	2	2	4	3	2,33333	0,22771
27	0	3	2	2	4	3	2,33333	0,22771
28	0	3	2	2	3	3	2,16667	0,19484
29	0	3	2	3	3	0	1,83333	0,24533
30	0	2	2	3	3	0	1,66667	0,22771

Tabuľka č. 2: Hodnotenie dosiahnutého stupňa od prvých 30 min. – 300 minút priebehu epileptického záchvatu (Racineho škála) u skúmanej skupiny zvierat.

Čas (min)	Zviera č. 1	Zviera č. 2	Zviera č. 4	Zviera č. 6	Zviera č. 7	Zviera č. 8	Priemer	SEM
31	0	2	4	3	3	3	2,5	0,22973
32	0	2	4	3	3	3	2,5	0,22973
33	0	2	4	3	2	0	1,83333	0,26701
34	0	2	4	3	2	3	2,33333	0,22771
35	0	2	5	2	2	0	1,83333	0,30581
36	0	2	5	2	2	0	1,83333	0,30581
37	0	2	5	2	2	3	2,33333	0,27217
38	0	2	3	3	2	3	2,16667	0,19484
39	0	2	3	5	2	2	2,33333	0,27217
40	3	2	3	3	2	2	2,5	0,09129
41	1	2	3	3	2	2	2,16667	0,12546
42	0	2	3	5	2	2	2,33333	0,27217
43	0	2	3	3	2	2	2	0,18257
44	0	2	3	3	2	2	2	0,18257
45	1	2	3	3	2	2	2,16667	0,12546
46	1	2	3	5	2	2	2,5	0,22973
47	1	2	3	3	2	2	2,16667	0,12546
48	1	2	3	3	2	2	2,16667	0,12546
49	1	2	3	2	2	2	2	0,10541
50	0	3	3	2	2	2	2	0,18257
60	0	2	3	2	2	2	1,83333	0,16387
120	0	2	2	0	2	2	1,33333	0,17213
170	0	2	2	0	2	2	1,33333	0,17213
180	0	2	2	0	2	2	1,33333	0,17213
225	0	2	2	0	2	5	1,83333	0,30581
240	0	2	0	0	2	2	1	0,18257
300	0	0	0	0	0	2	0,33333	0,13608

Tabuľka č. 3: Hodnotenie dosiahnutého stupňa počas prvých 30 minút priebehu epileptického záchvatu (Racineho škála) u kontrolnej skupiny zvierat.

Čas (min)	zviera č. 5	zviera č. 9	zviera č. 10	Priemer	SEM
0	0	0	0	0	0
1	0	2	2	1,333333	0,3849
2	3	2	3	2,666667	0,19245
3	3	5	4	4	0,333333
4	3	5	4	4	0,333333
5	3	3	4	3,333333	0,19245
6	4	2	4	3,333333	0,3849
7	3	3	3	3	0
8	3	3	3	3	0
9	2	5	3	3,333333	0,509175
10	2	5	3	3,333333	0,509175
11	2	5	3	3,333333	0,509175
12	4	3	3	3,333333	0,19245
13	3	3	3	3	0
14	3	3	3	3	0
15	3	3	3	3	0
16	2	3	3	2,666667	0,19245
17	2	3	3	2,666667	0,19245
18	3	3	3	3	0
19	3	3	3	3	0
20	3	3	3	3	0
21	3	3	3	3	0
22	3	3	3	3	0
23	3	3	3	3	0
24	2	3	3	2,666667	0,19245
25	2	3	3	2,666667	0,19245
26	2	3	3	2,666667	0,19245
27	2	3	3	2,666667	0,19245
28	2	3	3	2,666667	0,19245
29	2	3	3	2,666667	0,19245
30	2	3	3	2,666667	0,19245

Tabuľka č. 4: Hodnotenie dosiahnutého stupňa od prvých 30 min. – 300 minút priebehu epileptického záchvatu (Racineho škála) u kontrolnej skupiny zvierat.

Čas (min)	Zviera č. 5	Zviera č. 9	Zviera č. 10	Priemer	SEM
31	2	3	3	2,666667	0,19245
32	2	3	3	2,666667	0,19245
33	2	3	3	2,666667	0,19245
34	2	3	3	2,666667	0,19245
35	2	3	3	2,666667	0,19245
36	2	2	3	2,333333	0,19245
37	2	2	3	2,333333	0,19245
38	2	2	3	2,333333	0,19245
39	2	2	3	2,333333	0,19245
40	2	2	5	3	0,57735
41	2	2	3	2,333333	0,19245
42	2	2	3	2,333333	0,19245
43	2	2	3	2,333333	0,19245
44	2	3	3	2,666667	0,19245
45	2	3	3	2,666667	0,19245
46	2	2	3	2,333333	0,19245
47	2	2	3	2,333333	0,19245
48	2	3	3	2,666667	0,19245
49	2	3	3	2,666667	0,19245
50	2	3	3	2,666667	0,19245
60	2	2	3	2,333333	0,19245
120	2	2	3	2,333333	0,19245
170	5	2	3	3,333333	0,509175
180	0	2	3	1,666667	0,509175
225	0	5	5	3,333333	0,96225
240	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0

Tabuľka č. 5: Porovnanie priemerných hodnôt epileptického záchvatu (Racineho škála) a SEM medzi skúmanou skupinou a kontrolnou počas prvých 30 minút

Čas (min)	Priemer L-NPA	SEM L-PNA	Priemer ctrl	SEM ctrl	Rozdiel
0	0	0	0	0	0
1	0	0	1,3333333	0,3849	-1,3333
2	1,333333333	0,2509242	2,6666667	0,19245	-1,3333
3	1,833333333	0,2453267	4	0,33333	-2,1667
4	2,666666667	0,22771	4	0,33333	-1,3333
5	2,833333333	0,1254621	3,3333333	0,19245	-0,5
6	2	0,1825742	3,3333333	0,3849	-1,3333
7	2,666666667	0,2721655	3	0	-0,3333
8	3,166666667	0,0680414	3	0	0,16667
9	3,333333333	0,3103164	3,3333333	0,50918	0
10	3,333333333	0,2018434	3,3333333	0,50918	0
11	3,5	0,3118048	3,3333333	0,50918	0,16667
12	3,333333333	0,1721326	3,3333333	0,19245	0
13	2,333333333	0,3442652	3	0	-0,6667
14	2,666666667	0,291865	3	0	-0,3333
15	2,5	0,2934469	3	0	-0,5
16	2,166666667	0,2215267	2,6666667	0,19245	-0,5
17	2,833333333	0,1254621	2,6666667	0,19245	0,16667
18	2,666666667	0,1360828	3	0	-0,3333
19	3,166666667	0,1948409	3	0	0,16667
20	2,166666667	0,1948409	3	0	-0,8333
21	2,166666667	0,1948409	3	0	-0,8333
22	3	0,1825742	3	0	0
23	2,666666667	0,0860663	3	0	-0,3333
24	2,833333333	0,1254621	2,6666667	0,19245	0,16667
25	2,833333333	0,1254621	2,6666667	0,19245	0,16667
26	2,333333333	0,22771	2,6666667	0,19245	-0,3333
27	2,333333333	0,22771	2,6666667	0,19245	-0,3333
28	2,166666667	0,1948409	2,6666667	0,19245	-0,5
29	1,833333333	0,2453267	2,6666667	0,19245	-0,8333
30	1,666666667	0,22771	2,6666667	0,19245	-1

Tabuľka č. 6: Porovnanie priemerných hodnôt epileptického záchvatu (Racineho škála) a SEM medzi skúmanou skupinou a kontrolnou počas doby od prvých 30 minút po 300 minút

Čas (min)	Priemer L-NPA	SEM L-PNA	Priemer ctrl	SEM ctrl	Rozdiel
31	2,5	0,22973	2,66667	0,19245	-0,1667
32	2,5	0,22973	2,66667	0,19245	-0,1667
33	1,83333	0,26701	2,66667	0,19245	-0,8333
34	2,33333	0,22771	2,66667	0,19245	-0,3333
35	1,83333	0,30581	2,66667	0,19245	-0,8333
36	1,83333	0,30581	2,33333	0,19245	-0,5
37	2,33333	0,27217	2,33333	0,19245	0
38	2,16667	0,19484	2,33333	0,19245	-0,1667
39	2,33333	0,27217	2,33333	0,19245	0
40	2,5	0,09129	3	0,57735	-0,5
41	2,16667	0,12546	2,33333	0,19245	-0,1667
42	2,33333	0,27217	2,33333	0,19245	0
43	2	0,18257	2,33333	0,19245	-0,3333
44	2	0,18257	2,66667	0,19245	-0,6667
45	2,16667	0,12546	2,66667	0,19245	-0,5
46	2,5	0,22973	2,33333	0,19245	0,16667
47	2,16667	0,12546	2,33333	0,19245	-0,1667
48	2,16667	0,12546	2,66667	0,19245	-0,5
49	2	0,10541	2,66667	0,19245	-0,6667
50	2	0,18257	2,66667	0,19245	-0,6667
60	1,83333	0,16387	2,33333	0,19245	-0,5
120	1,33333	0,17213	2,33333	0,19245	-1
170	1,33333	0,17213	3,33333	0,50918	-2
180	1,33333	0,17213	1,66667	0,50918	-0,3333
225	1,83333	0,30581	3,33333	0,96225	-1,5
240	1	0,18257	0	0	1
300	0,33333	0,13608	0	0	0,33333